



# Etude de la réponse immunitaire T au cours de l'artérite à cellules géantes (Maladie de Horton)

Maxime Samson

## ► To cite this version:

Maxime Samson. Etude de la réponse immunitaire T au cours de l'artérite à cellules géantes (Maladie de Horton). Immunologie. Université de Bourgogne, 2014. Français. NNT : 2014DIJOS070 . tel-01199060

**HAL Id: tel-01199060**

**<https://theses.hal.science/tel-01199060>**

Submitted on 14 Sep 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

***Université de Bourgogne, UMR 1098***  
***Ecole doctorale Environnement-Santé***

Année 2014

N° ATTRIBUE PAR LA BIBLIOTHEQUE

**THESE**

Présentée pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE**

Discipline : SCIENCES DE LA VIE

Présentée et soutenue publiquement par

**Maxime SAMSON**

**Le 23 octobre 2014**

**ETUDE DE LA REPONSE IMMUNITAIRE T AU COURS DE**  
**L'ARTERITE A CELLULES GEANTES**  
**(MALADIE DE HORTON)**

**Membres du Jury**

Pr. Luc MOUTHON	Rapporteur
Pr. Thierry MARTIN	Rapporteur
Pr. Pierre MIOSSEC	Examineur
Pr. Philippe BONNIAUD	Examineur
Pr. Laurent MARTIN	Co-directeur de thèse
Pr. Bernard BONNOTTE	Directeur de thèse

# ***REMERCIEMENTS***

*A notre Maître et Directeur de Thèse,*

**Monsieur le Professeur Bernard Bonnotte,**

Vous nous faites l'honneur de nous accompagner dans notre carrière médicale et scientifique depuis plusieurs années maintenant. Vous nous avez confié ce travail et toujours guidé, soutenu et encouragé dans sa réalisation. Très tôt au cours de nos études médicales, nous avons voulu faire de la recherche et vous nous en avez donné l'opportunité. Vous nous avez transmis votre passion pour l'immunologie, nous avez accueilli dans votre équipe de recherche puis dans votre service où nous avons pu admirer votre ardeur et votre efficacité au travail, ainsi que votre curiosité et votre rigueur scientifique et médicale. Vous avez su mener de front carrière médicale et scientifique et construire une équipe de recherche dynamique où il est toujours agréable de venir travailler.

Nous espérons sincèrement rester dignes de votre confiance et pouvoir poursuivre nos travaux à vos côtés.

Veillez trouver ici le témoignage de toute notre admiration, de notre profond respect et de notre très sincère gratitude.

*A notre co-directeur de Thèse,*

**Monsieur le Professeur Laurent Martin**, vous avez codirigé ce travail de thèse et nous avez accompagné et aidé tout au long de sa réalisation, avec toujours disponibilité et bienveillance malgré les responsabilités et sollicitations qui vous incombent.

En espérant pouvoir continuer à travailler à vos côtés, veuillez trouver ici le témoignage de notre sincère gratitude et notre profond respect.

*Aux membres du Jury,*

**Monsieur le Professeur Luc Mouthon**, vous nous faites l'honneur de juger ce travail. Nous avons eu la chance de bénéficier de votre enseignement dans le cadre du DES de Médecine Interne puis de travailler à vos côtés dans votre service. Nous avons pu admirer l'étendue de votre savoir et de vos travaux de recherche, tant sur le plan médical que scientifique.

Veuillez trouver ici l'expression de notre sincère gratitude et de notre profond respect.

**Monsieur le Professeur Thierry Martin**, nous vous remercions d'avoir accepté de juger ce travail. Nous connaissons votre rigueur médicale et scientifique et admirons l'étendue de vos travaux dans le domaine de l'immunologie clinique et fondamentale.

Veuillez trouver ici le témoignage de notre sincère gratitude et de notre profond respect.

**Monsieur le Professeur Pierre Miossec**, vous avez suivi l'avancement de ce travail de thèse et nous faites maintenant l'honneur de le juger. Nous avons pu profiter de vos connaissances par nos lectures, sommes admiratifs de l'étendue de vos travaux dans le domaine de l'immunologie et sommes honorés d'avoir pu collaborer avec vous dans le cadre de ce travail de thèse.

Veillez trouver ici le témoignage de notre sincère gratitude et de notre profond respect.

**Monsieur le Professeur Philippe Bonniaud**, vous nous faites une nouvelle fois l'honneur de juger notre travail. Nous avons toujours admiré l'étendue de votre savoir, votre capacité à le transmettre, votre disponibilité et votre écoute auprès des patients. Nous admirons la carrière médicale et scientifique exemplaire que vous menez.

Veillez trouver ici le témoignage de notre sincère gratitude et de notre profond respect.

*A nos Maîtres,*

**Monsieur le Professeur Bernard Lorcerie,**

Vous avez suscité notre vocation pour la Médecine Interne et nous avez accueilli dans votre service. Au fil des années, vous avez su, grâce à votre clairvoyance, votre bienveillance, votre soutien et votre disponibilité, nous guider et nous transmettre les valeurs nécessaires à l'exercice de cette spécialité. Nous avons eu le privilège, au cours de notre formation et des années passées dans votre service, d'admirer l'étendue de votre savoir tant médical que général mais également eu la chance de bénéficier de la richesse, de la clarté et de la grande qualité de votre enseignement.

Veillez trouver ici le témoignage de toute notre admiration, de notre profond respect et de notre très sincère gratitude.

**Monsieur le Professeur Loïc Guillevin,**

Vous nous avez permis de concrétiser et développer notre passion pour les vascularites. Vous nous avez accueillis dans votre service et nous avons la chance de pouvoir travailler à vos côtés depuis plusieurs années maintenant. Nous avons eu l'occasion de constater et d'admirer l'immensité de votre savoir. Nous avons une profonde admiration pour la richesse et la modernité que vous avez su apporter à la Médecine Interne. Vous nous avez fait l'honneur de diriger notre thèse de Médecine et d'y apporter votre concours si précieux, avec disponibilité et bienveillance.

Veillez trouver ici le témoignage de toute notre admiration, de notre profond respect et de notre très sincère gratitude.

**A Cécile,**

Pour la joie de partager ma vie avec toi, pour ton énergie, ton soutien, ta tendresse, ton amour et tous les moments de bonheur passés, présents et à venir.

**A mon garçon,**

Déjà 7 mois que nous attendons ton arrivée. A la joie de te connaître et te chérir enfin.

**A mes Parents, à Clémentine, à Martin,**

Pour les valeurs essentielles que vous m'avez transmises (les parents surtout !). Pour votre soutien, votre écoute, votre amour et tous les moments de bonheur passés, présents et à venir.

**A mes Grands-parents,**

Pour les valeurs et les moments de bonheur que vous m'avez apportés.

**A Marie-Laurence et Pascal,**

Pour votre soutien et votre affection.

**A Renaud, à Fanny,**

En témoignage de mon affection.

**A toute ma Famille,**

**A mes amis,**

Fabien, Michael, Pierre-Yves, Aurélien, en témoignage de notre amitié.

Blandine, Benjamin, Cédric, Estelle, Mathieu, Olivier, Sandrine, Aurélien et *tous les autres*... Merci pour les bons moments passés et à venir. A notre amitié.



**A mes collègues du « meilleur service du monde »,**

Sabine, Vanessa, Nicolas, Aurélie. C'est un plaisir de travailler à vos côtés. Merci pour votre enseignement, votre soutien et votre aide dans la réalisation de ce travail.

**A l'équipe « Bonnotte »,**

Sylvain, j'apprécie beaucoup de travailler avec toi, au labo comme dans le service. Merci pour ton aide, essentielle et constante, tes idées et critiques toujours constructives, merci pour ton amitié.

Marion, un très grand merci pour ton aide, ta motivation et tes précieux conseils, plus qu'indispensables pour mener à bien de ce travail. Je n'ose pas penser à quoi aurait ressemblé cette thèse sans toi... chut !

Malika, merci pour ton soutien, ta motivation et ta bonne humeur, d'une exceptionnelle constance. Tiens bon dans tes nouvelles études. De nouvelles découvertes, d'un autre genre, t'attendent maintenant. Après une scientifique au top, je compte sur toi pour devenir un médecin au top !

Nona, thank you very much for your help and your relevant comments. You are a great scientist and your essential defect is not to be enough aware of that! I am sure JACI is just the beginning of your success with HuMOSC!

Alexandrine, merci pour ton aide, ta motivation et ta bonne humeur. Je suis sûr que la chance va te sourire et que les data vont pleuvoir. En tout cas, tu le mérites !

Fam-Ky, merci pour ton soutien et ta gentillesse.

Jennifer, je n'ai pas oublié que c'est toi qui m'a appris à manipuler, jusqu'à parfois très tard dans la nuit ! Je me demande aussi si ce n'est pas toi qui m'a un jour mis dans la tête que les Th17 étaient violets... Merci beaucoup et à bientôt j'espère...

**A toutes les personnes avec qui j'ai eu le plaisir de travailler, et notamment :**

**A l'équipe du laboratoire d'immunologie du CHU de Dijon,**

Daniela, merci pour ton soutien et pour m'avoir supporté pendant les FIDIS !

Monsieur le Docteur Olsson, Marie-Henriette, Annie, Dominique, Isabelle, merci pour votre soutien et votre écoute.

**Au Docteur Serge Aho**, merci pour m'avoir communiqué votre expérience dans le domaine statistique, mais aussi ouvert l'esprit vers d'autres horizons.

**A Hervé**, merci pour ton aide sur le plan méthodologique et statistique. A notre amitié et nos collaborations futures.

**A tous les médecins** des services de :

- Médecine Interne et Maladies Systémiques du CHU de Dijon
- Rhumatologie du CHU de Dijon
- Gériatrie du CHU de Dijon
- Médecine Interne du CHU de Besançon et de l'Hôpital Belle Isle de Metz.

Merci pour votre implication, constante, efficace et indispensable à la réussite de ces travaux de recherche.

**A toute l'équipe de l'unité INSERM 1098**, au Professeur Philippe Saas, au Docteur Christophe Ferrand.

**A l'équipe du plateau technique de cytométrie** : Arlette, Anabelle, Serge. Merci pour nous mettre à disposition des outils toujours plus performants.

**Au Conseil Régional de Bourgogne, au CHU de Dijon et aux laboratoires ROCHE Chugaï**, pour avoir financé ces travaux.

**A la direction de la recherche clinique et de l'innovation du CHU de Dijon**, pour leur aide dans la mise en place et la conduite de ces travaux.

**A tous les patients** qui ont participé à ces études.

# ***RESUME***

## RESUME

---

Ce travail de thèse a été axé sur l'étude de la réponse immunitaire T chez des patients atteints d'artérite à cellules géantes (ACG) et de pseudo-polyarthrite rhizomélique (PPR). Plusieurs études cliniques successives interrégionales ont permis d'inclure de nombreux patients (57 ACG et 27 PPR) des Centres Hospitaliers (CH) Universitaires et des CH de l'interrégion Est. Les échantillons sanguins ont été étudiés dans le laboratoire de l'unité INSERM U1098. Tout d'abord, nous avons confirmé l'implication des lymphocytes Th17 dans la pathogénie de l'ACG et avons montré pour la première fois leur implication au cours de la PPR. De plus, notre étude des lymphocytes T (LT) CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> a permis de mieux comprendre les mécanismes de plasticité entre les réponses Th1 et Th17 au cours de ces deux pathologies. Nous avons complété ces travaux par l'étude de la réponse T régulatrice en montrant qu'il existe un déficit quantitatif en Treg au cours de l'ACG et la PPR. Dans la suite de ce travail, nous avons mis en évidence, chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, que le blocage de la voie de signalisation de l'IL-6 par un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de l'IL-6 permet de corriger le déséquilibre de la balance Th17/Treg, en diminuant la réponse Th17 et en augmentant simultanément la réponse T régulatrice, à l'inverse des corticoïdes qui diminuent le pourcentage de Th17 sans corriger le déficit en Treg. Enfin, dans la dernière partie de ce travail, nous avons montré pour la première fois que les LT CD8<sup>+</sup> étaient également impliqués dans la pathogénie de l'ACG et la PPR.

Ces résultats ont permis de progresser dans les connaissances physiopathologiques de l'ACG et la PPR en évoluant d'un modèle articulé autour d'un déséquilibre de la balance Th1/Th2 vers celui d'un déséquilibre de la balance Th17/Treg et permettent de proposer des thérapeutiques mieux ciblées pour l'ACG et la PPR.

## ABSTRACT

---

The aim of this thesis was to investigate the T-cell immune response in the course of giant-cell arteritis (GCA) and polymyalgia rheumatica (PMR). Several studies conducted by our team allowed us to obtain blood samples from many patients affected by GCA (n=57) and PMR (n=28). Immunological studies were performed in INSERM U1098, University Of Burgundy, Dijon, France.

We firstly demonstrated the implication of Th17 and CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> T cells in the pathogenesis of these two diseases, thus extending the knowledge in the plasticity mechanisms arising between Th1 and Th17 cell-immune responses in GCA and PMR. Furthermore, we investigated the regulatory T cell immune response in these two affections, demonstrating that although being functional, the percentage of circulating Treg was decreased in GCA and PMR patients. As interleukin-6 (IL-6) had been shown to control the Th17/Treg balance, we studied Th17 and Treg frequencies in rheumatoid arthritis patients treated with an anti-IL-6 receptor antibody (tocilizumab). We showed that the blockade of the IL-6 pathway was able to correct the Th17/Treg imbalance by decreasing the number of Th17 cells and simultaneously increasing that of Treg. Finally, we demonstrated for the first time the implication of CD8<sup>+</sup> T cells in the pathogenesis of GCA and PMR.

This thesis allowed us to progress in the knowledge of the pathogenesis of GCA making the pathogenesis model progress from a Th1/Th2 to a Th17/Treg imbalance model. Altogether, these data deciphering the immune response in the pathogenesis of GCA and PMR bring new knowledge which will lead to better targeted therapies.

# ***SOMMAIRE***

# SOMMAIRE

---

<b>RESUME .....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>13</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES.....</b>	<b>17</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>18</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>22</b>
1. Introduction et épidémiologie.....	22
2. Manifestations cliniques de l'ACG .....	24
a) Signes généraux .....	26
b) Manifestations céphaliques.....	26
c) Manifestations rhumatologiques .....	26
d) Manifestations oculaires .....	27
e) Manifestations artérielles .....	27
f) Manifestations atypiques .....	29
3. Signes biologiques de l'ACG .....	29
4. Diagnostic de l'ACG .....	31
a) Biopsie d'artère temporale .....	31
b) Critères diagnostiques .....	34
c) Examens d'imagerie .....	34
5. Traitement de l'ACG .....	36
a) Corticothérapie.....	36
b) Immunosuppresseurs, immunomodulateurs et biothérapies .....	37
c) Traitements associés .....	39
6. Modèle physiopathologique de l'ACG .....	41
a) La rupture de tolérance et l'activation des DC résidentes de l'adventice .....	41
b) Le recrutement des LT CD4 <sup>+</sup> et leur polarisation .....	43
c) Le remodelage vasculaire.....	45
d) Le rôle de la réponse immunitaire humorale.....	47
e) Le rôle des polynucléaires neutrophiles.....	48
f) Interactions Notch-Notch ligands au cours de l'ACG.....	49
g) Le rôle du vieillissement dans la physiopathologie de l'ACG.....	52
7. Objectifs.....	53



<b>ETUDE DES LYMPHOCYTES T CD4 AU COURS DE L'ACG ET LA PPR</b>	55
1. Introduction : polarisation de la réponse immunitaire T et lymphocytes T régulateurs	55
a) Polarisation lymphocytaire T, réponse Th1 et Th2	55
b) Les lymphocytes Th17	58
c) Les lymphocytes Th9	69
d) Les lymphocytes Th22	70
e) Les lymphocytes T régulateurs (Treg)	70
f) Le concept de plasticité	81
2. <i>Article 1</i> : "Th1 and Th17 lymphocytes expressing CD161 are implicated in Giant Cell Arteritis and Polymyalgia Rheumatica Pathogenesis"	85
3. <i>Article 2</i> : "Treg cells in giant cell arteritis: might they be another target for adjuvant treatments? Comment on the article by Samson <i>et al.</i> Reply"	103
4. <i>Article 3</i> : "Functionally relevant Treg cells are present in giant cell arteritis lesions: comment on the article by Samson <i>et al.</i> Reply"	106
5. <i>Article 4</i> : "Are IL-10 <sup>+</sup> regulatory Th17 cells implicated in the sustained response to glucocorticoid treatment in patients with giant cell arteritis? Comment on the paper of Espigol-Frigole <i>et al.</i> "	110
6. <i>Article 5</i> : "Is TNF- $\alpha$ really involved in giant cell arteritis pathogenesis?"	113
<b>LA BALANCE TH17/TREG ET LE ROLE DE L'IL-6</b>	116
1. <i>Article 6</i> : "Inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg imbalance in patients with rheumatoid arthritis"	116
2. <i>Article 7</i> : "Does tocilizumab indeed decrease the frequency of Th17 cells: comment on the paper from Thiolat A. <i>et al.</i> "	130
3. Réponse T régulatrice au cours de l'ACG	134
<b>ETUDE DES LYMPHOCYTES T CD8 AU COURS DE L'ACG ET LA PPR</b>	136
1. Introduction	136
2. Etude des LT CD8 <sup>+</sup> au cours de l'ACG : résultats préliminaires	145
<b>DISCUSSION et PERSPECTIVES</b>	159
<b>CONCLUSION</b>	170
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	172
<b>LISTE DES ANNEXES</b>	197
<b>PUBLICATIONS PERSONNELLES</b>	234

# LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

---

## **Figures**

<b>Figure 1</b> : Biopsie d'artère temporale au cours de l'ACG .....	32
<b>Figure 2</b> : Marquage de pERM sur des BAT de patients affectés d'ACG à BAT positive, négative ou de sujets contrôles.....	33
<b>Figure 3</b> : Voie de signalisation Notch.....	50
<b>Figure 4</b> : Interactions Notch-Notch ligand au cours de l'ACG.....	51
<b>Figure 5</b> : La différenciation des Th17 et la dichotomie Th17/Treg .....	61
<b>Figure 6</b> : Polarisation des LT CD4 <sup>+</sup> CD161 <sup>+</sup> .....	65
<b>Figure 7</b> : Mécanismes d'action des Treg.....	79
<b>Figure 8</b> : La différenciation des lymphocytes T auxiliaires .....	83
<b>Figure 9</b> : Rôle des lymphocytes Th17 dans la physiopathologie de la PR.....	118
<b>Figure 10</b> : Apoptose déclenchée par la liaison FasL/Fas.....	138
<b>Figure 11</b> : Pénétration et mécanisme d'action du granzyme B au sein de la cellule cible .	139
<b>Figure 12</b> : Analyse par cytométrie en flux du phénotype des LT CD8 <sup>+</sup> circulants chez 30 patients (23 ACG et 7 PPR) et 21 sujets sains appariés pour l'âge .....	148
<b>Figure 13</b> : Marqueurs de cytotoxicité et profil cytokinique des LT CD8 <sup>+</sup> au cours de l'ACG et la PPR.. .....	150
<b>Figure 14</b> : Etude par immunohistochimie de l'infiltrat en lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup> dans une biopsie d'artère temporale d'un patient atteint d'ACG.....	151
<b>Figure 15</b> : Effet de la corticothérapie sur la cytotoxicité et le profil cytokinique des LT CD8 <sup>+</sup> circulants. ....	152
<b>Figure 16</b> : Expression des récepteurs de chémokines par les LT CD8 <sup>+</sup> et mesures des concentrations sériques de chémokines au cours de l'ACG et la PPR.....	154
<b>Figure 17</b> : Modèle physiopathologique de l'ACG .....	166

## **Tableaux**

<b>Tableau 1</b> : Principales manifestations de l'ACG au diagnostic. ....	25
<b>Tableau 2</b> : Caractéristiques phénotypiques des lymphocytes Th17, Th1 classiques et Th1 non classiques.....	64
<b>Tableau 3</b> : Caractéristiques phénotypiques des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> .....	137
<b>Tableau 4</b> : Caractéristiques des patients et des sujets sains à l'inclusion .....	147

# LISTE DES ABREVIATIONS

---

## A

**Ac** : Anticorps  
**ACG** : Artérite à Cellules Géantes  
**aCE** : anticorps anti-cellules endothéliales  
**aCL** : anticorps anti-cardiolipines  
**ACR** : *American College Of Rheumatology*  
**ADAM** : *A Disintegrin And Metalloproteinase domain-containing protein*  
**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique  
**ADP** : Adénosine DiPhosphate  
**Ag** : Antigène  
**AHR** : *Aryl Hydrocarbon Receptor*  
**AIF** : *Apoptosis-Inducing Factor*  
**AMP** : Adénosine MonoPhosphate  
**ANCA** : Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires  
**AnxA1** : Annexine A1  
**AOMI** : Artérite Oblitérante des Membres Inférieurs  
**ARN** : Acide RiboNucléique  
**ATP** : Adénosine TriPhosphate  
**AVC** : Accident Vasculaire Cérébral

## B

**BAT** : Biopsie d'Artère Temporale  
**BID** : *BH3 Interacting-domain Death agonist*

## C

**CAD** : *Caspase-Activated Deoxynuclease*  
**CCLx** : Chémokine de motif CC  
**CCRx** : Récepteur de chémokine de motif CC  
**CD** : *Cluster of Differentiation*  
**CDR3** : *Complementary Determining Region*  
**CD8<sup>+</sup> Treg** : lymphocyte T CD8<sup>+</sup> régulateur  
**CE** : Cellules Endothéliales  
**CINC** : *Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant*  
**CMH** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
**CML** : Cellules Musculaires Lisses  
**CMV** : Cytomégalovirus  
**CPA** : Cellule Présentatrice d'Antigène  
**CRH** : *Corticotropine-Releasing Hormone*  
**CRP** : Protéine C-Réactive  
**CTLA-4** (ou CD152) : *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4*  
**CXCLx** : Chémokine de motif CxC  
**CXCRx** : Récepteurs de chémokine de motif CxC

## D

**DAS28** : *Disease Activity Score 28*  
**DC** : *Dendritic Cell* (cellule dendritique)  
**DFF40** : *DNA Fragmentation 40*

## E

**EBV** : *Ebstein-Barr Virus*  
**EndoG** : Endonucléase G

## **F**

**FADD** : *Fas-associated death domain protein*

**FasL** : Ligand de Fas

**FDG** : FluoroDesoxyGlucose

**FoxP3** : *Forkhead/winged-helix box Protein 3*

## **G**

**G-CSF** : *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*

**GITR** : *Glucocorticoid Induced TNF Receptor family Related gene*

**GM-CSF** : *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*

## **H**

**Hb** : Hémoglobine

**HLA** : *Human Leukocyte Antigen*

## **I**

**ICAD** : *Inhibitor of Caspase-Activated Deoxynuclease*

**ICAM-1** : *IntraCellular Adhesion Molecule-1*

**ICOS** : *Inductible COStimulator*

**IDM** : Infarctus Du Myocarde

**IDO** : Indoleamine 2,3-Dioxygenase

**IFN-γ** : Interféron-gamma

**Ig** : Immunoglobuline

**IL-x** : Interleukine-x

**IL-1Ra** : antagoniste du récepteur de l'IL-1β

**IL4I1** : *Interleukin-4-Induced gene 1*

**ILT** : *Immunoglobulin-Like Transcript*

**IPEX** : *Immune dysfunction Polyendocrinopathy Enterocolopathy X-linked syndrome*

**IRF4** : *Interferon Regulatory Factor 4*

**IRM** : Imagerie par Résonance Magnétique

**ITIM** : *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*

## **L**

**LAG-3** : *Lymphocyte Activation Gene-3*

**LB** : Lymphocyte B

**LEI** : Limitante Élastique Interne

**LLT1** : *Lectin-Like Transcript 1*

**LPS** : LipoPolySaccharide

**LT** : Lymphocyte T

## **M**

**MAI** : Maladie Auto-Immune

**MCP-1** (ou CCL2) : *Monocyte Chemotactic Protein-1*

**MH** : Maladie de Horton

**MMP** : Métalloprotéases

**MP** : Macrophages

## **N**

**NFAT** : *Nuclear Factor of Activated T-cells*

**NF-κB** : *Nuclear Factor-kappa B*

**NK** : cellule Natural Killer

**NKRP1** (ou KLRB1 ou CD161) : *Killer cell Lectin-like Receptor subfamily B, member 1*

**NLR** : *(NOD)-like receptor*

**NOD2** : *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2*

**NOIAA** : Neuropathie Optique Ischémique Antérieure Aiguë

## **O**

**OACR** : Occlusion de l'Artère Centrale de la Rétine

## **P**

**PAMPs** : *Pathogen Associated Molecular Patterns*

**PBMC** : *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (cellules mononucléées du sang périphérique)

**PCR** : *Polymerase Chain Reaction*

**PDGF** : *Platelet-Derived Growth Factor*

**pERM** : *Phospho-Ezrin Radixin Moesin*

**PMA** : *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*

**PNB** : Polynucléaires Basophiles

**PNE** : Polynucléaires Éosinophiles

**PNN** : Polynucléaires Neutrophiles

**PPR** : Pseudo-Polyarthrite Rhumatoïde

**PR** : Polyarthrite Rhumatoïde

**PRR** : *Pattern Recognition Receptor*

**PTX-3** : Pentraxine-3

## **R**

**RANK** : *Receptor Activator of NFκB*

**RANKL** : *Receptor Activator of NFκB Ligand*

**RANTES** (ou CCL5) : *Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*

**RBPJ** : *Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin kappa J region*

**ROCK** : *Rho kinase*

**RORC** : *Retinoic acid-related Orphan Receptor C*

**ROR-γt** : *Retinoic acid-related Orphan Receptor-γt*

## **S**

**S1P1** : Sphingosine-1-Phosphate

**SCID** : *Severe Combined Immunodeficiency Syndrome* (déficit immunitaire combiné sévère)

**SEP** : Sclérose en Plaques

**STAT** : *Signal Transducer and Activator of Transcription*

## **T**

**T-bet** : *T-box expressed in T cells*

**Tc** : (lymphocyte) T cytotoxique

**TCR** : *T Cell Receptor (récepteur des cellules T)*

**TDM** : Tomodensitométrie

**TEP** : Tomographie par Emission de Positons

**TGF-β** : *Transforming Growth Factor-bêta*

**Th** : (lymphocyte) T *helper* (auxiliaire)

**TLR** : *Toll-Like Receptor*

**TNF-α** : *Tumor Necrosis Factor-alpha*

**TRAIL** : *Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand*

**Treg** : lymphocyte T CD4<sup>+</sup> régulateur

## **V**

**VCAM-1** : *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*

**VDCA-2** : *Voltage Dependent Anion-selective Channel protein 2*

**VEGF** : *Vascular Endothelial Growth Factor*

**VPN** : Valeur Prédictive Négative

**VPP** : Valeur Prédictive Positive

**VS** : Vitesse de Sédimentation

# ***INTRODUCTION***

# INTRODUCTION

---

## **1. Introduction et épidémiologie**

L'artérite à cellules géantes (ACG), anciennement appelée maladie de Horton (MH) est une vascularite granulomateuse classée, avec la maladie de Takayasu, dans le groupe des vascularites des artères de gros calibre [1,2]. Le terme d'artérite temporale ne doit plus être utilisé pour parler de l'ACG puisque l'atteinte des artères temporales n'est pas spécifique de l'ACG et peut se rencontrer dans d'autres vascularites comme la périartérite noueuse ou les vascularites associées aux anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires (ANCA). L'ACG est la vascularite la plus fréquente de l'adulte de plus de 50 ans. Le pic d'incidence se situe entre 70 et 80 ans. La prévalence de l'ACG varie selon les ethnies. Même si les données sont parfois contradictoires, la maladie est très rare chez les africains, les arabes, les hispaniques et les asiatiques [3-7]. Les prévalences les plus élevées sont rapportées parmi les populations d'origine scandinave comme dans le comté d'Olmsted dans le Minnesota où la prévalence a été estimée à 18,8 pour 100 000 habitants [8]. En France, la prévalence de l'ACG était de 9,4 cas pour 100 000 habitants de plus de 55 ans dans une étude menée en Loire Atlantique [9]. Dans une étude que nous avons réalisée récemment, l'incidence annuelle de l'ACG à biopsie d'artère temporale (BAT) positive dans la ville de Dijon (151 543 habitants en 2007) était de 10,9 et 13,4/100 000 habitants par an dans la population âgée de plus de 50 et 55 ans respectivement [10] (article présenté en Annexe). Ce gradient d'incidence Nord-Sud et la fréquence accrue de la maladie dans les pays scandinaves ont fait suspecter l'existence de prédispositions génétiques à développer une ACG. Plusieurs travaux font état d'une augmentation significative de la prévalence des allèles HLA-DRB1\*0401, DRB1\*0404 ou DRB1\*0408, exprimés chez 60% des patients présentant une pseudopolyarthrite rhizomélisque (PPR) ou une ACG [11-13]. D'autres allèles HLA de classe I et II ont été associés à la ACG [14]. Ces associations soulignent le rôle prépondérant de l'immunité adaptative cellulaire au cours du développement de l'ACG. Les allèles HLA sont en effet responsables d'une restriction des peptides présentés aux LT CD4<sup>+</sup> lors de l'interaction CMH-II, peptide

et récepteur T (TCR). Comme au cours de la polyarthrite rhumatoïde, il existerait au cours de l'ACG un « épitope partagé ». En effet, une conservation de la séquence d'acides aminés entre les positions 28 et 31 du 2<sup>ème</sup> domaine de la chaîne  $\beta$  des molécules HLA de classe II associées à l'ACG (HLA-DRB1\*0401, HLA-DRB1\*0404 et HLA-DRB1\*0408) a été décrite [12]. D'autres gènes ont été étudiés et des polymorphismes des gènes du *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ) [13], de l'interleukine-6 (IL-6) [15], de la *corticotropine-releasing hormone* (CRH) [16], de molécules d'adhésion cellulaire (ICAM-1), du promoteur du gène de RANTES (ou CCL5), du récepteur de chémokine CCR5 ou du gène de l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1Ra) [13] ont été liés à un risque accru de développer une ACG.

Certains travaux ont aussi décrit une variation cyclique et saisonnière de l'incidence de la pathologie, faisant donc évoquer la participation d'un facteur environnemental et notamment infectieux dans le déclenchement de la maladie [17,18]. Il s'agit souvent d'études cas/contrôle, non confirmées sur de plus grandes séries, qui ont détecté, par PCR ou Hybridation *in situ*, une augmentation de l'ADN de bactéries ou de virus dans les artères temporales de patients atteints d'ACG : Cytomégalovirus, Parvovirus B19, Herpès Simplex Virus et *Chlamydia pneumoniae* [19]. Plus récemment, des auteurs ont mis en évidence un possible rôle inducteur d'une souche de *Burkholderia* (*Burkholderia pseudomallei-like*). Cette souche a été isolée par PCR 16S à partir de BAT issues de patients atteints d'ACG. Les auteurs ont également détecté du lipopolysaccharide (LPS) de *Burkholderia* dans le sérum et les artères temporales des patients. Les cultures *in vitro* de BAT provenant de patients affectés d'ACG ont entraîné l'apparition de colonies de *Burkholderia pseudomallei-like*, qui, une fois injectées à des souris, ont induit une inflammation au niveau des vaisseaux pulmonaires. Ce travail, présenté au congrès de l'*American College Of Rheumatology* (ACR) en 2012, n'a pas encore été publié [20].



## **2. Manifestations cliniques de l'ACG**

L'ACG est une panartérite inflammatoire à cellules géantes, non nécrosante, de topographie segmentaire et focale, touchant les artères de gros calibre, préférentiellement les branches de la carotide externe et en particulier l'artère temporale superficielle. Cependant, tous les gros troncs artériels (carotides, aorte, sous-clavières) peuvent être touchés [21]. La présentation histologique classique de l'ACG est une artérite à cellules géantes avec un infiltrat inflammatoire granulomateux, habituellement localisé à la jonction intima-média, constitué de lymphocytes T (LT) en majorité CD4<sup>+</sup>, de macrophages (MP) et de cellules géantes multinucléées [2].

La topographie des atteintes rend compte des manifestations ischémiques de la maladie : céphalées, claudication de la mâchoire, baisse d'activité visuelle, nécrose du scalp ou de la langue et manifestations neurologiques centrales. Ces manifestations ischémiques s'accompagnent de signes généraux (asthénie, fièvre, perte de poids, anorexie), reflet de l'intense réaction inflammatoire associée. L'ACG s'associe dans 27 à 56% à un tableau de PPR, dont la physiopathologie est commune avec celle de l'ACG [22]. Les principales manifestations cliniques rencontrées au cours de l'ACG sont résumées dans le tableau 1.

	Gonzalez-Gay MA <i>et al.</i> [23]	Abdul-Rahman AM <i>et al.</i> [24]	Hernandez- Rodriguez J <i>et al.</i> [25]	Khalifa M <i>et al.</i> [26]	Liozon E <i>et al.</i> [27]	Chaudhry IA <i>et al.</i> [3]	Smetana GW <i>et al.</i> [28]*
<b>Durée d'étude</b>	1981-2004	1996-2005	14 ans	1986-2003	1997-2002	1983-2004	
<b>Ville, Pays</b>	Lugo, Espagne	Otago, Nouvelle-Zélande	Barcelone, Espagne	Tunisie	Limoges, France	Riyadh, Arabie Saoudite	
<b>Nombre de patients</b>	N = 240	N = 70	N = 75	N = 96	N = 175	N = 102	
<b>Manifestations cliniques, %</b>							
<i>Fièvre</i>	9,5	12,9	48	56	54,9	4,9	1,2 (0,98-1,4)
<i>Signes généraux</i>	60,8			75	71,2		
<i>Asthénie</i>		17,1					
<i>Anorexie</i>		14,3					1,2 (0,96-1,4)
<i>Amaigrissement</i>		12,9	57	64	51,2	3,9	1,3 (1,1-1,5)
<i>Céphalées</i>	86,4	67,1	80	92	77,1	38	Toutes 1,2 (1,1-1,4) Temporale 1,5 (0,78-3,0)
<i>Claudication de la mâchoire</i>	40,8	24,3	45	41	39,4	8,8	4,2 (2,8-6,2)
<i>Anomalie d'une artère temporale</i>	72,9		81	85	60,3	17,6	
<i>Hyperesthésie du cuir chevelu</i>	33,8	22,9	48	40	51,8	27	
<i>Pseudopolyarthrite rhizomélique</i>	40	31,4	42,6	56	26,9		0,97 (0,76-1,2)
<i>Manifestations visuelles (toutes)</i>	23,3			34			1,1 (0,93-1,3)
<i>Amaurose fugace</i>		10	8	5	19,4		0,85 (0,58-1,2)
<i>Diplopie</i>				1			3,4 (1,3-8,6)
<i>Cécité</i>	12,9	14,3	10,6	11	12,6		
<b>Manifestations biologiques</b>							
<i>Anémie</i>		2,9			64,1		
<i>Elévation de la VS</i>		95,7 (>20 mm/h)		100 (>20 mm/h)	93,5 (>50 mm/h)		
<i>CRP &gt; 15 mg/L</i>				100 (34/34)	95,1		

**Tableau 1 : Principales manifestations de l'ACG au diagnostic.** Adapté de Borchers AT *et al.* [22].

\*Cette colonne représente les résultats d'une méta-analyse de 41 études publiées entre 1966 et 2000 et décrivant les caractéristiques de patients affectés d'ACG à BAT positive ou négative. Les résultats représentent le rapport de vraisemblance positif (intervalle de confiance à 95%) de chaque signe pour le diagnostic d'ACG.

**CRP** : protéine C-réactive ; **VS** : vitesse de sédimentation.

a) Signes généraux

La fièvre est un signe habituel de l'ACG, retrouvé dans 10 à 60% des cas selon les séries. Elle dépasse le plus souvent 38°C et atteint parfois 39°C, sans frissons mais parfois avec des sueurs nocturnes. L'asthénie est quasi constante et un amaigrissement d'importance variable est noté dans la majorité des cas, pouvant atteindre 10% du poids corporel [18,22,29,30].

b) Manifestations céphaliques

Les céphalées représentent le principal symptôme ischémique de l'ACG et sont souvent de localisation temporale ou fronto-temporale, uni ou bilatérales. Leur intensité est très variable et elles peuvent parfois être discrètes ou au contraire intenses voire insomniantes. Elles peuvent être déclenchées par le froid, le contact et s'associer à une hyperesthésie du cuir chevelu. Parfois, les céphalées sont occipitales, faciales, maxillaires, rétro-orbitaires [18,22,29,30]. Les anomalies de l'artère temporale font partie des critères diagnostiques de l'*American College of Rheumatology* (ACR) [31]. L'artère temporale peut apparaître nettement visible et former un cordon saillant, induré et tortueux, qui peut être dur, sensible et épaissi à la palpation. Les pouls temporaux peuvent être diminués ou abolis. La peau en regard de l'artère temporale peut être normale, œdématiée ou inflammatoire [18,22,29,30].

c) Manifestations rhumatologiques

Les manifestations rhumatologiques de l'ACG sont dominées par la PPR. Il s'agit de douleurs d'horaire inflammatoire siégeant à la ceinture scapulaire et au niveau des deux hanches et pouvant irradier vers le cou, les bras et le rachis. Les douleurs provoquent une limitation de la mobilité active et il s'y associe une raideur articulaire et péri-articulaire. Les radiographies standards ne retrouvent pas d'anomalie. L'échographie articulaire ou la tomographie par émission de positons (TEP) peuvent mettre en évidence une bursite ou une synovite des articulations des ceintures scapulaires ou pelviennes [30,32,33].

#### d) Manifestations oculaires

Par leur fréquence et leur gravité, les manifestations ophtalmologiques de l'ACG en dominent le pronostic car elles peuvent provoquer une cécité définitive. Avant l'ère des corticoïdes, leur fréquence était de 50 à 60% des cas et pouvait entraîner une cécité complète dans 26% des cas. Depuis le recours systématique à la corticothérapie, leur fréquence n'est plus que de 25 à 30% avec une cécité définitive dans 14 à 18% des cas, les chiffres variant d'une série à l'autre en fonction du mode de recrutement des patients. Dans la majorité des cas, les manifestations ophtalmologiques surviennent avant le début de la corticothérapie, ou parfois peu de temps après le début de celle-ci. La neuropathie optique ischémique antérieure aiguë (NOIAA) est l'atteinte la plus fréquente (77-92% des cas), l'occlusion de l'artère centrale de la rétine (OACR) ou d'une de ses branches (souvent temporale supérieure) est plus rare (4-21% des cas). D'autres atteintes ophtalmologiques sont possibles : neuropathie optique rétrobulbaire (3-6%), nodules dysoriques, occlusion choroïdienne. Le fond d'œil et l'angiographie rétinienne sont les examens de référence pour le diagnostic des manifestations ophtalmologiques de l'ACG [34]. Dans 4,6 à 15% des cas, il existe une atteinte de l'oculomotricité se manifestant par un ptosis ou une diplopie uni ou bilatérale, ou encore une limitation douloureuse des mouvements oculaires, une exophtalmie ou une ophtalmoplégie internucléaire [34].

#### e) Manifestations artérielles

##### **Aortite**

La fréquence de l'aortite au cours de l'ACG est probablement sous-estimée. Dans les séries cliniques ou autopsiques, une fréquence d'environ 15% a été rapportée [35,36] mais la fréquence est bien supérieure dans les études prospectives dans lesquelles une tomodensitométrie (TDM) aortique est réalisée : 45 à 65% [21,37]. Outre la TDM aortique, une aortite peut être diagnostiquée par l'angio-IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) ou la TEP qui permettent une exploration fonctionnelle de l'inflammation artérielle et qui peuvent détecter plus précocement des lésions d'aortite que la TDM qui montre seulement un épaississement homogène et circonférentiel de la paroi aortique [38]. L'existence d'une aortite au diagnostic

semble associée à des rechutes plus fréquentes et à une mortalité cardiovasculaire plus élevée à long terme [39] mais ceci doit être confirmé dans des études prospectives [38]. Actuellement, la mise en évidence d'une aortite asymptomatique ne modifie pas les modalités et la durée de la corticothérapie au cours de l'ACG [38].

L'aortite peut se constituer à bas bruit ou révéler la maladie par la survenue d'une de ses complications : anévrisme ou dissection [40]. Le délai moyen entre le diagnostic d'ACG et la survenue d'une complication est estimé à 2,5 ans pour l'aorte abdominale et 5,8 ans pour l'aorte thoracique [41]. Les données sont contradictoires concernant le risque de survenue d'un anévrisme de l'aorte au cours de l'ACG [42,43]. Une étude récente, portant sur près de 7000 patients atteints d'ACG et comparés à 41994 témoins, mais avec un suivi moyen de seulement 4,3 ans, a rapporté un risque relatif de développer un anévrisme de l'aorte de 1,92, indépendamment des autres facteurs de risque cardiovasculaires [44].

### ***Autres complications cardiovasculaires au cours de l'ACG***

L'ACG peut s'étendre au niveau des artères des membres. L'atteinte des membres supérieurs prédomine (63% des cas), est souvent bilatérale et affecte essentiellement les artères sous-clavières et axillaires, provoquant un syndrome de Raynaud, une claudication des membres, une abolition d'un ou plusieurs pouls, une inégalité tensionnelle, voire des complications trophiques [45,46].

L'atteinte artérielle des membres inférieurs et les manifestations coronariennes survenant au cours de l'ACG sont plus difficiles à mettre en relation directe avec l'ACG compte tenu de la fréquence des lésions athéromateuses à cet âge et du rôle potentiellement favorisant de la corticothérapie au long cours. Une étude récente comparant 3408 patients atteints d'ACG à 17027 sujets contrôles appariés pour l'âge et le sexe a rapporté l'incidence des principales complications vasculaires au cours de l'ACG (infarctus du myocarde [IDM], accidents vasculaires cérébraux [AVC] et artérite des membres inférieurs [AOMI]). En comparaison à la population témoin, les incidences étaient de 10 vs 4,9 événements pour 1000 patients-année (PA) pour l'IDM, 8 vs 6,3 pour l'AVC et 4,2 vs 2 pour l'AOMI, soit des *hazard ratio* à 2,06 pour l'IDM, 1,28 pour l'AVC et 2,13 pour l'AOMI. Le risque de

survenue d'un évènement cardiovasculaire était plus important au cours du premier mois, soulignant le fait que l'ACG est associée, indépendamment des autres facteurs de risque cardiovasculaires, à un risque accru de complication cardiovasculaire [47].

Les AVC sont rares au cours de l'ACG et peuvent intéresser le territoire carotidien et plus fréquemment vertébro-basilaire [48-50]. Dans une étude récente, nous avons démontré qu'un AVC survenait chez 7% des patients atteints d'ACG à BAT positive, correspondant à une incidence annuelle de 10,9 cas pour 100 000 habitants dans la population de plus de 50 ans résidant à Dijon. Ces AVC, à l'inverse de ceux de la population générale de plus de 50 ans, survenaient préférentiellement chez des hommes et affectaient le territoire vertébro-basilaire [10] (article présenté en Annexe).

f) Manifestations atypiques

La neuropathie périphérique est exceptionnelle mais de fréquence probablement sous-estimée. Il peut s'agir de mononévrites, multinévrites, polynévrites ou radiculopathies [51]. Des atteintes pulmonaires ou pleuropéricardiques [52,53], digestives [54], utérines et ovariennes [55], hépatiques [56] ou endocriniennes [57] sont également rapportées.

### **3. Signes biologiques de l'ACG**

Il n'existe pas de marqueur biologique spécifique de l'ACG. De façon quasi constante, les patients présentent un syndrome inflammatoire et l'élévation de la vitesse de sédimentation (VS) à plus de 50 mm à la 1<sup>ère</sup> heure fait partie des critères diagnostic de l'ACR [31]. La VS est en moyenne à  $93 \pm 23$  mm/h, la CRP à  $94 \pm 63$  mg/L et les autres protéines de l'inflammation (fibrinogène, haptoglobine, orosomucoïde) sont également élevées. Une anémie (hémoglobine  $<12$  g/dL) inflammatoire est observée dans 54,6% des cas et une thrombocytose dans 48,8% des cas [58].

Néanmoins, la VS peut être inférieure à 50 mm/h dans 10,8% des cas [59] et sa normalité n'exclut donc pas le diagnostic. De plus, des associations entre un

syndrome inflammatoire modéré et la survenue de complications ischémiques oculaires ont été rapportées [60].

Témoignant du possible rôle de l'immunité humorale, la présence de différents types d'auto-anticorps a été rapportée au cours de l'ACG mais sans que leurs rôles pathogéniques soient clairement démontrés. Ainsi, des anticorps anti-cardiolipines (aCL) ont été détectés chez 20 à 50% des patients affectés d'ACG, mais à taux faible, sans anticorps anti- $\beta$ 2glycoprotéine-I et sans association avec une augmentation du risque ischémique [61-65]. Ces aCL disparaissent après 3 mois de corticothérapie [65,66]. Des anticorps anti-cellules endothéliales (aCE) ont été détectés chez 33% des patients atteints d'ACG [67]. Ces aCE ne sont pas spécifiques de l'ACG car ils ont été aussi retrouvés chez des sujets sains [68] ou atteints de maladie auto-immune [69]. Cependant, au cours de l'ACG, ces aCE seraient des immunoglobulines (Ig) G dirigées contre des auto-antigènes spécifiques exprimés par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (CML), tels que la vinculine, la lamine A/C, l'annexine V, le VDCA-2 (*voltage dependent anion-selective channel protein 2*) et d'autres protéines impliquées dans le métabolisme énergétique cellulaire [70].

Plus récemment, des anticorps dirigés contre la chaîne lourde de la ferritine humaine ont été détectés chez 92% des patients affectés d'ACG ou de PPR non traitée, mais aussi chez 29% des patients affectés de lupus et seulement 1% des sujets sains [71]. L'intérêt du dosage de ces anticorps pour le diagnostic d'ACG n'a pas été confirmé dans une étude récente démontrant qu'ils étaient positifs chez 73% des patients dont la BAT était positive, 2,5% des sujets sains mais également 32% de patients suspects d'ACG chez qui le diagnostic n'avait finalement pas été retenu [72].

La pentraxine-3 (PTX3), qui structurellement appartient à la même famille de protéines que la CRP mais qui est produite par les cellules endothéliales et les leucocytes activés, est augmentée dans le sérum des patients atteints d'ACG comparativement à des sujets sains, atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR) ou présentant une cardiopathie ischémique. La PTX3 était significativement plus élevée chez les patients ayant récemment présenté une NOIAA [73]. Chez les patients en rémission, la PTX3 était significativement plus basse qu'au diagnostic. Enfin, la

corrélation entre le taux de PTX3 et la VS ou la CRP était faible, suggérant que la combinaison de ces biomarqueurs pourrait améliorer les performances diagnostiques au cours de l'ACG [73].

#### **4. Diagnostic de l'ACG**

##### **a) Biopsie d'artère temporale**

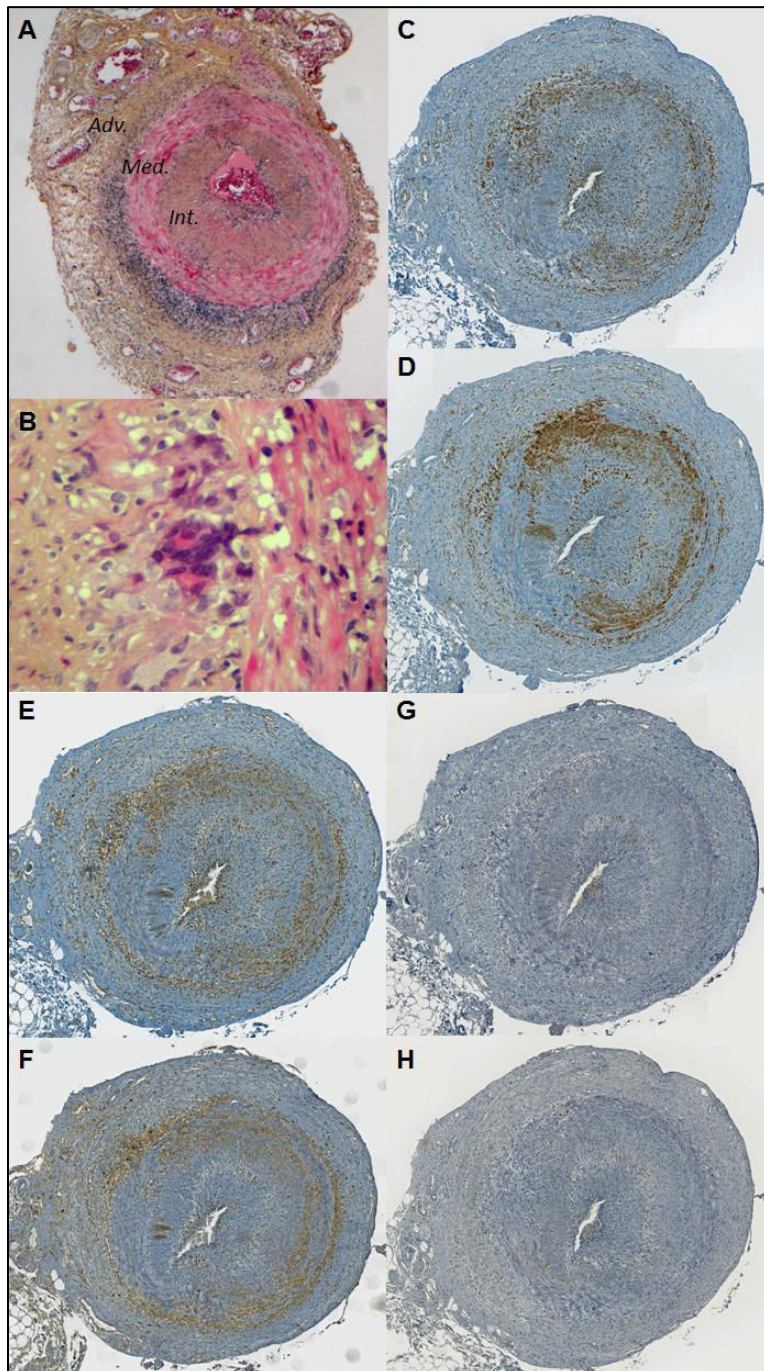
La biopsie d'artère temporale (BAT) est essentielle au diagnostic et permet de justifier le recours à une corticothérapie prolongée. Sa réalisation ne doit pas retarder la mise en route du traitement car, même si elles deviennent moins typiques après 1 à 2 semaines de traitement, les lésions histologiques de l'ACG peuvent persister 4 semaines après le début de la corticothérapie [74,75].

Les lésions histologiques classiquement observées sont des lésions de panartérite granulomateuse segmentaire et focale. L'ensemble de la paroi artérielle (intima-média-adventice) est le siège d'un infiltrat inflammatoire granulomateux, prédominant habituellement à la jonction intima-média, constitué de lymphocytes T (LT) en majorité CD4<sup>+</sup>, de macrophages (MP) et de cellules géantes multinucléées. Les lymphocytes B sont quasi inexistants dans la paroi artérielle (figure 1). Cependant, 50% seulement des BAT présentent cet aspect typique. Dans les autres biopsies, l'infiltrat inflammatoire chronique est constitué de lymphocytes et de quelques polynucléaires neutrophiles ou éosinophiles sans cellules géantes. Il n'existe jamais de nécrose fibrinoïde au cours de l'ACG. Lorsqu'elles affectent la paroi de l'artère temporale ou les *vasa vasorum*, ces lésions doivent faire évoquer un autre diagnostic : périartérite noueuse ou polyangéite microscopique notamment [2].

La sensibilité de la BAT varie de 70 à plus de 90% [18,22,29], ce qui signifie que le diagnostic d'ACG peut être retenu même si la BAT est négative [31]. Les lésions d'ACG sont en effet segmentaires et focales et peuvent donc manquer sur le fragment biopsié. Ainsi, la BAT doit idéalement être réalisée du côté le plus symptomatique et mesurer au moins 1 à 2 cm de longueur [76]. Une longueur seuil de 0,5 cm après fixation dans le formol semble être associée avec une augmentation du rendement diagnostique de la BAT [77]. Dans tous les cas, l'ensemble du bloc doit être analysé puisque les lésions d'ACG sont segmentaires et focales. La



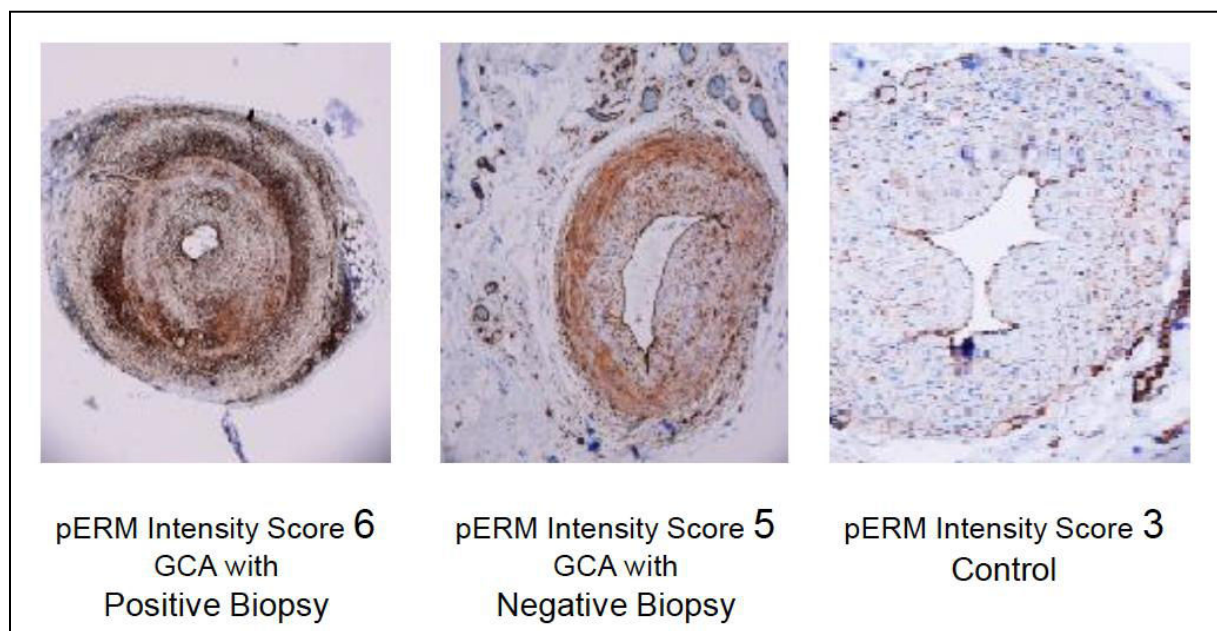
réalisation d'une BAT bilatérale permet d'augmenter la rentabilité diagnostique de 12,7% par rapport à une BAT unilatérale [78]. De plus, il faut rappeler que, même si cette atteinte est très fréquente, l'ACG n'atteint pas de façon constante les artères temporales. A titre d'exemple, une grande proportion (30-40%) des patients présentant une atteinte des gros vaisseaux documentée à l'imagerie ont une BAT négative [22,46,79].



**Figure 1 : Biopsie d'artère temporale au cours de l'ACG.**

**A, B :** biopsie d'artère temporale d'un patient atteint d'ACG. Coloration au May Grünwald Giemsa. Fragmentation de la media et hyperplasie intimale responsables d'une sténose de la lumière vasculaire. Panartérite avec infiltrat constitué de cellules mononucléées prédominant à la jonction adventice/media et présence de cellules géantes multinucléées (B). **C, D, E, F, G, H :** étude immunohistochimique de l'infiltrat cellulaire affectant la paroi artérielle d'une artère temporale de patient atteint d'ACG. Toutes les coupes de l'artère temporale ont été réalisées au niveau de la même lésion. Les cellules positives marquées par les différents anticorps utilisés apparaissent colorées en brun : CD3 pour les LT (C), CD68 pour les macrophages (D), IFN- $\gamma$  pour les lymphocytes Th1 (E), IL-17 pour les lymphocytes Th17 (F), Foxp3 pour les Treg (G) et CD20 pour les lymphocytes B (H). Adv : adventice, Med : média, Int : intima. Grossissement : x40.

Une équipe a récemment rapporté l'intérêt du marquage de la *Phospho-Ezrin Radixin Moesin* (pERM) sur des BAT [80]. pERM est phosphorylée par la *Rho kinase* (ROCK), une enzyme dont l'activité sérine/thréonine kinase intervient dans l'organisation du cytosquelette, l'adhésion et la migration cellulaires, la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaires. ROCK est également impliquée dans la phosphorylation de IRF-4 (*Interferon response factor-4*), un facteur de transcription impliqué dans la production d'IL-17 et d'IL-21 et donc la polarisation Th17. ROCK intervient dans la physiopathologie de l'athérome et du lupus ; de plus, l'effet anti-inflammatoire des statines pourrait être secondaire à l'inhibition de l'activité de ROCK [81]. Les lymphocytes Th17 étant impliqués dans la physiopathologie de l'ACG [82-84], les auteurs ont proposé de mesurer l'activité de ROCK, via un marquage de pERM, sur les BAT de patients atteints d'ACG à BAT positive (n=19), négative (n=17) et de sujets contrôles (n=18). Un marquage intense de pERM (score > 4/6, figure 2) a permis de distinguer les artères des contrôles de celles des patients affectés d'ACG à BAT négative avec une sensibilité de 94% et une spécificité de 56%, soit une valeur prédictive négative de 91%. Un marquage de pERM en cas de BAT négative pourrait donc améliorer le rendement diagnostique de la BAT, surtout lorsque son analyse macroscopique est normale [80].



**Figure 2 : Marquage de pERM sur des BAT de patients affectés d'ACG à BAT positive, négative ou de sujets contrôles.** Issu de Lally L *et al.* 2014 [80].

### *b) Critères diagnostiques*

Les critères de classification actuellement utilisés dans la littérature sont ceux de l'ACR, publiés en 1990 [31]. Ces critères ont été élaborés en comparant 214 patients atteints d'ACG à 593 patients affectés d'une autre vascularite. Il s'agit donc de critères de classification par rapport aux autres vascularites et non de critères diagnostiques.

Ces critères sont les suivants :

- Age au début de la maladie  $\geq 50$  ans
- Céphalée d'apparition récente
- Anomalie de l'artère temporale à la palpation (induration, diminution d'un pouls non liée à l'athérosclérose)
- VS  $> 50$  mm à la 1<sup>ère</sup> heure
- BAT anormale montrant une vascularite caractérisée par une infiltration de la paroi vasculaire par des cellules mononucléées et/ou par l'existence de lésion(s) granulomateuse(s) avec présence de cellules géantes

La présence d'au moins 3 de ces 5 critères, permet de classer la maladie comme une ACG parmi d'autres vascularites avec une sensibilité de 93,5% et une spécificité de 91,2% [31].

Une étude danoise a analysé l'incidence annuelle de l'ACG avec ou sans BAT positive. Dans la population danoise de plus de 50 ans, elle était de 20,4 / 100 000 en considérant toutes les ACG contre 15,1 / 100 000 quand ils ne considéraient que les ACG à BAT positive [85].

### *c) Examens d'imagerie*

Même s'ils n'apparaissent pas dans les critères diagnostiques cités ci-dessus, un certain nombre d'examens d'imagerie peut contribuer au diagnostic d'ACG et suffire à débiter un traitement. Il s'agit de l'échographie-Doppler, de l'angio-TDM, de l'angio-IRM et de la TEP couplée à la TDM. Ces examens permettent surtout de mettre en évidence une aortite ou une atteinte inflammatoire des vaisseaux supra-

aortiques. De plus, l'échographie-Doppler et l'angio-IRM peuvent montrer des anomalies témoignant d'une inflammation au niveau de la paroi de l'artère temporale.

L'échographie-Doppler est un examen simple et non invasif qui permet notamment d'étudier l'artère temporale en recherchant une sténose ou une occlusion artérielle et surtout le signe du halo qui est un épaississement pariétal circulaire et homogène de la paroi artérielle. Ce signe du halo a une sensibilité et une spécificité comparée à la BAT de 69 et 82% respectivement [86]. C'est surtout la combinaison des trois types d'anomalies qui a le plus de valeur, atteignant alors une sensibilité de 95% et une spécificité de 85% [87].

L'échographie-Doppler permet également l'étude de l'inflammation de la paroi de l'aorte et des artères sous-clavières et axillaires [88].

L'angio-TDM permet de diagnostiquer une aortite, définie par un épaississement circonférentiel et homogène de plus de 3 mm d'épaisseur de la paroi aortique, qui régresse sous corticothérapie [21,38].

L'angio-IRM cérébrale, réalisée à l'occasion d'un bilan de céphalées inexplicables, peut mettre en évidence des anomalies de l'artère temporale ou de ses branches, à type d'épaississement pariétal et/ou d'hypersignal sur les séquences T1 fat-sat et T2 [89]. L'angio-IRM permet également de faire le diagnostic d'aortite [38].

La TEP couplée à la TDM ne permet pas d'évaluer l'artère temporale du fait de sa petite taille et de sa proximité avec le cerveau qui fixe fortement le fluorodésoxyglucose (FDG). Cet examen permet par contre une détection très sensible de l'inflammation de la paroi des gros vaisseaux [90,91]. Une méta-analyse récente a évalué la rentabilité du TEP-scan pour le diagnostic d'ACG et estimé sa sensibilité à 80% et sa spécificité à 89% soit une valeur prédictive positive (VPP) de 85% et une valeur prédictive négative (VPN) de 88% [92]. De plus, la diminution de l'hyperfixation vasculaire du traceur est corrélée avec le contrôle des signes cliniques et la régression du syndrome inflammatoire [93]. Néanmoins, lorsque le patient présente des lésions d'athérosclérose, l'interprétation de certaines anomalies des gros vaisseaux est parfois difficile [93,94]. De plus, en cas d'aortite, un hypermétabolisme persiste après 3 mois de traitement dans 50% des cas, sans réel lien avec le risque de rechute et alors que le syndrome inflammatoire a disparu [95].

## **5. Traitement de l'ACG**

### *a) Corticothérapie*

Le traitement de référence de l'ACG reste à l'heure actuelle, et comme il y a 50 ans, la corticothérapie prolongée par voie orale, en débutant à forte dose : 0,7 mg/Kg/j à 1 mg/Kg/j de prednisone selon l'existence ou non de complications vasculaires, notamment ophtalmologiques [96]. Ensuite, la dose est progressivement diminuée. Il n'y a pas de consensus sur la durée totale de la corticothérapie. Celle-ci est parfois maintenue plus de 3 ans, très rarement moins de un an. Ce traitement est efficace même s'il existe de rares cas de corticorésistance. En revanche, il est responsable d'importants effets secondaires, tout particulièrement dans cette population âgée : diabète, fractures ostéoporotiques, dyslipidémie, surpoids, troubles cutanés, cataracte, glaucome, infections, hypertension artérielle [97]. En France, le schéma classique consiste à débuter à la dose de 0,7 mg/Kg/j d'équivalent (sauf en cas d'atteinte ophtalmique où la dose de 1 mg/Kg/j est recommandée) jusqu'à disparition des signes cliniques et du syndrome inflammatoire. Puis une décroissance rapide de 10% par semaine est réalisée jusqu'à atteindre mi-dose. Une phase de plateau débute alors pour 3 à 6 mois avant de continuer la décroissance au rythme de 1 mg toutes les 2 à 4 semaines.

La tendance actuelle est d'essayer de diminuer l'exposition des patients à la corticothérapie, en diminuant la posologie initiale et/ou en accélérant la décroissance des doses. Par exemple, le schéma proposé par la Mayo Clinic propose une dose d'attaque à 0,6 mg/Kg/j d'équivalent prednisone pendant un mois, réduite d'un quart à la fin du premier mois, de moitié à la fin du deuxième mois (0,3 mg/Kg/j) puis une décroissance plus lente pour arriver à 8 à 10 mg/j en fin de première année de traitement [98].

En moyenne, quel que soit le schéma adopté, les patients reçoivent 8,2 mg/j d'équivalent prednisone après un an de traitement [99]. On estime que la dose de 7,5 mg/j d'équivalent prednisone peut être atteinte chez 40% des patients au bout de 6,5 mois [97]. Ce résultat, issu d'une étude rétrospective reprenant 120 dossiers d'ACG a été récemment confirmé dans un essai prospectif multicentrique où 47%



des patients atteignaient la dose de 0,1 mg/Kg/j de prednisone après 6 mois de traitement [100].

*b) Immunosuppresseurs, immunomodulateurs et biothérapies*

Deux facteurs rendent donc compte de la gravité de l'ACG : le risque de complications vasculaires inhérent à la maladie (NOIAA, AVC, IDM) ; et les complications dues à la corticothérapie prolongée (immunodépression, ostéoporose, hypertension artérielle, diabète), qui sont observées dans 35 à 65% des cas dans la première année de traitement [18,97]. En cas de corticorésistance, imposant une majoration des doses, ces complications atteignent 70% des patients.

Parvenir à diminuer la dose totale et la durée de la corticothérapie est donc particulièrement important au cours de l'ACG. Les stratégies d'épargne stéroïdienne visant à raccourcir la durée du traitement sont parfois utilisées. Différents médicaments ont été testés sans succès : antipaludéens [101,102], azathioprine [103], et plus récemment les anti-TNF- $\alpha$  [100,104-106]. Le méthotrexate est le seul traitement immunosuppresseur à avoir démontré une efficacité modérée en terme d'épargne cortisonée [107-111]. Le cyclophosphamide, malgré le manque de données dans la littérature, pourrait aussi avoir un intérêt dans les formes corticorésistantes, lorsqu'il existe une contre-indication aux corticoïdes à forte dose ou en cas d'échec du méthotrexate [112-114]. La dapsonsone a montré son efficacité sur la diminution du nombre de rechutes de la maladie mais les effets indésirables potentiellement graves (agranulocytose) survenus au cours de son utilisation dans l'ACG, ne font pas retenir cette thérapeutique comme une alternative [115].

De récents progrès dans la connaissance de la physiopathologie de l'ACG permettent d'envisager de nouveaux traitements, notamment l'inhibition de la voie de signalisation de l'interleukine-6 (IL-6) par le tocilizumab, un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre les récepteurs soluble et membranaire de l'IL-6. L'IL-6 est une cytokine particulièrement importante dans la physiopathologie de l'ACG. Cette cytokine intervient dans la promotion de la phase aiguë de la réaction inflammatoire. Weyand *et al.* ont montré en 1993 qu'il existait une augmentation significative des concentrations plasmatiques d'IL-6 chez les patients atteints d'ACG non traitées. L'administration de corticoïdes était suivie d'une baisse rapide des concentrations d'IL-6. Lors des rechutes de la maladie ou à l'arrêt du traitement, le taux d'IL-6

augmentait parallèlement à la réapparition des symptômes cliniques [116]. D'autres travaux ont confirmé que les taux sériques d'IL-6 étaient corrélés à la sévérité des manifestations cliniques, aux taux de la VS et de la CRP [117]. Compte tenu de ces données scientifiques, plusieurs équipes ont déjà utilisé avec succès le tocilizumab chez des patients atteints d'ACG [118-131].

Seitz et *al.* ont rapporté une série de 7 patients présentant une vascularite des gros vaisseaux : 2 artérites de Takayasu et 5 ACG (3 BAT positives et 2 BAT négatives mais avec une aortite à l'IRM). Parmi les 5 ACG, 2 ont été traitées d'emblée par tocilizumab. Les 3 autres recevaient déjà des corticoïdes (respectivement 10, 20 et 27,5 mg/j de prednisone) en association à du méthotrexate pour 2 d'entre eux. Les patients atteints d'ACG étaient âgés de 70 ans en moyenne. Le tocilizumab a été administré à la dose de 8 mg/Kg une fois par semaine pendant un mois puis une fois par mois ensuite. Après un recul de 8,3 mois, tous les patients atteints d'ACG étaient en rémission clinique et biologique (CRP<3 mg/L) sans qu'il n'y ait eu de problème de tolérance. Le tocilizumab a été maintenu en perfusions mensuelles chez 3 patients et a été stoppé après 7 mois chez les 2 autres atteints d'ACG. La corticothérapie a été diminuée chez tous les malades et même stoppée chez l'un d'entre eux. Aucune rechute n'a été observée, même après l'arrêt du tocilizumab [123].

L'équipe de C. Salvarini a également rapporté une petite série de patients présentant une vascularite des gros vaisseaux (dont 2 ACG), réfractaire au traitement habituel par corticoïdes et parfois abatacept ou infliximab, chez qui l'ajout de tocilizumab à la dose de 8 mg/Kg par mois a permis le contrôle des symptômes, la normalisation du syndrome inflammatoire et la diminution de la dose de corticoïdes. Le suivi au cours de cette étude était de 6 mois. Aucun effet indésirable n'a été observé [122].

Plus récemment, Unizoni et *al.* ont rapporté une série de 10 patients (2 artérites de Takayasu, 7 ACG et une PPR) réfractaires à la corticothérapie seule ou ayant rechuté sous traitement. Les patients ont reçu un traitement pendant une durée moyenne de 7,8 mois et ont été suivis pendant 27 mois en moyenne (16 à 60 mois). Tous les patients sont entrés en rémission et la dose de prednisone a été significativement diminuée après traitement par tocilizumab (20,8 à 4,1 mg/jour ;  $p<0,0001$ ). Les données de tolérance dans cette population ont été rassurantes :

aucune réaction allergique lors des perfusions, aucune complication infectieuse ou digestive. Quatre cas de neutropénie modérée (940 à 1300/mm<sup>3</sup>) ont été observés, mais sans aucune complication infectieuse. Une élévation modérée (<3N) des transaminases a été mise en évidence chez 4 patients mais n'a jamais conduit à un arrêt du traitement par tocilizumab. Un patient de 82 ans est décédé d'un IDM après une colectomie. Un patient a rechuté 2 mois après l'arrêt du tocilizumab [124].

### c) Traitements associés

#### **Aspirine**

Les patients atteints d'ACG ont un risque accru de complication cardiovasculaire [47,132]. Dans une étude récente portant sur 3408 patients atteints d'ACG, les taux d'incidence des IDM, AVC et maladies vasculaires périphériques étaient de 10, 8 et 4,2 évènements pour 1000 patients-année respectivement, contre 4,9, 6,3 et 2 évènements pour 1000 patients-année respectivement dans une population contrôle composée de 17027 individus appariés pour le sexe et l'âge. Après ajustement sur les facteurs de risque cardiovasculaire classiques, les patients atteints d'ACG avaient un risque accru de survenue d'IDM, AVC ou maladie vasculaire périphérique, avec des *Hazard Ratio* de 2,06, 1,28 et 2,13 respectivement. Ce surrisque était beaucoup plus prononcé dans les premiers mois d'évolution de la maladie [47]. Néanmoins, cette étude comporte des limites et notamment l'absence de données concernant le résultat de la BAT et le nombre de données manquantes concernant les facteurs de risque cardiovasculaire. En effet, le rôle des facteurs de risque cardiovasculaire traditionnels dans la survenue de complications ischémiques sévères au cours de l'ACG, et notamment de l'hypertension artérielle, a été démontré [133]. Cependant, il est difficile de savoir si ce surrisque observé au cours de l'ACG est lié à la maladie ou aux corticoïdes utilisés pour la traiter [134,135]. Néanmoins, l'absence de surrisque chez les patients atteints de PPR est un argument en faveur du rôle de la vascularite dans la survenue des évènements cardiovasculaires [136].

C'est pour ces raisons que de l'aspirine à dose anti-agrégante est souvent prescrite au cours de l'ACG, notamment au début de la maladie. Cependant, cette prescription n'a pas de base physiopathologique forte puisque l'aspirine n'a d'effet



que sur la composante thrombotique alors que les manifestations ischémiques au cours de l'ACG sont le résultat du remodelage de la paroi vasculaire induit par le processus inflammatoire, avec une composante d'œdème et d'inflammation pariétale, de prolifération des CML, d'hyperplasie intimale et de thrombose [137,138].

Un effet protecteur de l'aspirine sur la survenue d'évènements cardiovasculaires au cours de l'ACG est démontré par certaines études [139-141], non retrouvé dans d'autres [142], alors que d'autres travaux retrouvent davantage de complications céphaliques initiales chez les patients exposés à l'aspirine, comparativement aux non exposés [143,144].

La plupart des praticiens prescrivent donc de l'aspirine à dose anti-agrégante ou de l'héparine à dose isocoagulante jusqu'à la normalisation du syndrome inflammatoire. Passée cette période, nous manquons de preuves solides pour recommander la prescription systématique d'aspirine. Néanmoins, il est licite de maintenir cette prescription chez les patients ayant présenté une manifestation ischémique au diagnostic, ou chez ceux à haut risque cardiovasculaire. Mais dans ce cas, les patients ont en fait une autre indication que l'ACG pour la prescription d'anti-agrégants.

## **Statines**

L'impact de la prescription de statines sur la prévention du risque vasculaire au cours de l'ACG n'est pas connu. Par ailleurs, ces médicaments, à qui on attribue un rôle anti-inflammatoire *via* une inhibition de la voie Th17 grâce à l'inhibition de la Rho kinase [80,81], impliquée dans la pathogénie de l'ACG [80], ne semblent pourtant pas avoir d'influence sur l'évolution de la maladie [145,146].

## **6. Modèle physiopathologique de l'ACG**

Cette revue de la littérature a fait l'objet de deux publications : dans *la Presse Médicale* en 2012 [147] et dans *Clinical and Experimental Rheumatology* en 2013 [148] (articles disponibles en annexes).

L'ACG affecte les artères de gros calibre, principalement l'aorte et les artères supra-aortiques, qui possèdent une importante limitante élastique interne (LEI) et des *vasa vasorum*, vaisseaux de très petit calibre cheminant dans l'adventice pour assurer la vascularisation de la paroi artérielle. A l'inverse, les artères intracrâniennes ont une paroi plus fine, avec moins de tissu élastique et pas de *vasa vasorum*. Ces différences anatomiques expliquent que ces artères soient exceptionnellement atteintes au cours de l'ACG [149].

### **Les 3 phases de la physiopathologie de l'ACG**

Le modèle physiopathologique de l'ACG peut se diviser en 3 phases :

- La rupture de tolérance et l'activation des cellules dendritiques (DC)
- Le recrutement, l'activation et la polarisation des LT
- Le recrutement des MP et le remodelage vasculaire

#### **a) La rupture de tolérance et l'activation des DC résidentes de l'adventice**

Dans l'adventice des artères saines se trouvent des DC myéloïdes à l'état immature, définies par un phénotype S100<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CD83<sup>-</sup>CMH-II<sup>low</sup> [137,150-152]. Comme dans tous les autres tissus, ces DC immatures ont un rôle de sentinelle et phagocytent les antigènes de l'environnement proche. Elles participent à l'induction de tolérance vis-à-vis de ces antigènes et à l'immunoprotection dont bénéficie la paroi artérielle. Lorsqu'elles reçoivent un signal « Danger », par le biais de récepteurs spécialisés que sont les *Toll Like Receptor* (TLR), les DC acquièrent un phénotype mature (S100<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD83<sup>+</sup>CD80/86<sup>+</sup>CMH-II<sup>high</sup>) et produisent alors des cytokines et des chémokines qui vont être responsables du recrutement et de la polarisation des LT. La nature du signal « Danger » n'est pas connue avec

précision mais l'hypothèse infectieuse est la plus probable [17-19]. Une forte expression du CMH-II et de molécules de costimulation (CD80 et CD86) va permettre aux DC devenues matures d'activer les LT recrutés dans la paroi artérielle. Au cours de la PPR, les DC acquièrent aussi un phénotype mature mais infiltrant uniquement l'adventice alors qu'au cours de l'ACG, les DC infiltrant toutes les tuniques artérielles [151,152].

En utilisant un modèle murin humanisé d'ACG dans lequel des artères temporales humaines sont greffées dans des souris affectées de déficit immunitaire sévère (SCID), l'équipe de C. Weyand a montré que la déplétion en cellules CD83<sup>+</sup> (DC matures) permettait de diminuer les lésions de vascularite, l'infiltrat lymphocytaire T et la production d'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ), démontrant ainsi le rôle primordial des DC de l'adventice dans la physiopathologie de l'ACG [152]. L'injection de TNF- $\alpha$ , d'adjuvant complet de Freund (ligand du TLR2) ou de lipopolysaccharide (LPS) (ligand de TLR4) induisait l'activation des DC immatures des artères de sujets sains greffées aux souris SCID. Par la suite, les LT autologues transférés étaient recrutés dans la paroi artérielle et étaient responsables du développement de la vascularite [152]. Parmi les différents signaux « Danger » testés, le LPS, ligand du TLR4, avait permis d'obtenir la plus forte activation des DC : expression d'un phénotype mature (CD83<sup>+</sup>), forte production de chémokines (CCL18, CCL19 et CCL21) et de cytokines (IL-18) [152].

L'expression des TLR dans la paroi des artères humaines saines et de gros calibre a été étudiée *post-mortem* chez 37 patients [153]. Les TLR sont exprimés de façon quasi exclusive par les DC myéloïdes qui se situent à la jonction adventice/média. Dans toutes les artères, la plupart des TLR (TLR1 à 9) sont exprimés : TLR2 et 4 de façon ubiquitaire, TLR7 et 9 de façon inconstante, alors que les TLR1, 3, 5, 6 et 8 sont exprimés de façon variable, conférant une véritable carte d'identité à chaque territoire artériel. Le profil d'expression des TLR de l'artère temporale est différent de celui des autres gros vaisseaux : les TLR2, 4 et 8 sont fortement exprimés dans l'artère temporale à l'inverse des TLR1, 5 et 6 dont l'expression est faible. L'aorte et surtout la carotide sont deux artères dont le profil d'expression des TLR est le plus proche de celui de l'artère temporale. Ces données pourraient expliquer le tropisme de l'ACG pour l'aorte et le territoire carotidien externe [153].

A la différence d'une réponse immunitaire classique, les DC matures ne migrent pas dans le ganglion de drainage satellite de l'artère au cours de l'ACG. Elles sécrètent les chémokines CCL19 et CCL21 et expriment leur récepteur (CCR7), ce qui a pour effet de les piéger dans l'adventice [151].

*b) Le recrutement des LT CD4<sup>+</sup> et leur polarisation*

La déplétion en LT CD4<sup>+</sup> dans le modèle de souris SCID greffées avec des artères de sujet atteint d'ACG entraîne une diminution des lésions de vascularite, alors que cet infiltrat se maintient indéfiniment en l'absence de déplétion [154]. Ces résultats sont en faveur d'un rôle essentiel des LT CD4<sup>+</sup> dans la physiopathologie de l'ACG. L'analyse du réarrangement du gène du TCR des LT CD4<sup>+</sup> infiltrant la paroi des artères de sujets atteints d'ACG a mis en évidence une restriction oligoclonale du répertoire T. Ces résultats suggèrent fortement l'existence d'une présentation antigénique par les DC matures aux LT CD4<sup>+</sup> qui vont ensuite proliférer de façon clonale [155-157]. De plus, des clones identiques de LT CD4<sup>+</sup> ont été isolés des BAT droite et gauche chez des patients atteints d'ACG [157].

Les LT CD4<sup>+</sup> sont absents des parois des artères de sujets sains. Les LT CD4<sup>+</sup> sont recrutés suite à l'activation et la maturation des DC de l'adventice qui produisent certaines chémokines : CCL18, CCL19, CCL20 et CCL21 [19,137]. Les LT CD4<sup>+</sup> infiltrent d'abord l'adventice, via les *vasa vasorum* qui expriment fortement les molécules d'adhésion nécessaires à la diapédèse : *intracellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) et *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) [19,137].

Il a été montré que la nature du signal danger activant les DC de l'adventice influait sur la nature des chémokines et des LT CD4<sup>+</sup> qui infiltrent la paroi artérielle. Ainsi, l'activation par un ligand du TLR4 (LPS), favorise la production de CCL20 qui provoque une infiltration par des LT CD4<sup>+</sup> exprimant CCR6, le récepteur de CCL20. Ces LT CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> prolifèrent et infiltrent toutes les tuniques artérielles aboutissant à une panartérite [158]. De façon intéressante, CCR6 est un récepteur fortement exprimé par les LT *helper* 17 (LTh17), à la différence des LTh1 qui expriment CXCR3, le récepteur des chémokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11 [159]. A l'inverse, l'activation des DC par un ligand de TLR5 provoque une infiltration par des LT

CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup> qui n'envahissent pas toutes les tuniques de l'artère et provoquent simplement une périartérite [158].

Une fois recrutés dans la paroi artérielle, les LT CD4<sup>+</sup> sont activés par les DC qui leur présentent un antigène dont la nature est actuellement inconnue. L'environnement cytokinique local, riche en IL-12, IL-18, IL-23, IL-6 et IL-1 $\beta$  va favoriser la polarisation lymphocytaire Th1 et Th17. Le pourcentage de LTh17 circulants est augmenté dans le sang des patients atteints d'ACG comparativement à des sujets sains [82,160-162]. L'étude de la réponse immunitaire T faisant l'objet de cette thèse, nous détaillerons davantage l'implication des sous-populations T dans la physiopathologie de l'ACG au cours de la discussion générale.

D'après les travaux de C. Weyand, la sensibilité aux corticoïdes est différente pour les LTh1 et les LTh17. Sous l'effet de la corticothérapie, le pourcentage de LTh17 et leur présence dans la paroi artérielle diminuent significativement alors qu'aucune modification n'est notée concernant les LTh1. En effet, la corticothérapie entraîne une diminution de l'expression des cytokines Th17 (IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-23) mais ne modifie pas la production de cytokines Th1 (IL-12) par les monocytes circulants et infiltrant les artères de sujets atteints d'ACG [82]. C. Weyand a émis l'hypothèse que deux voies distinctes d'activation lymphocytaire T, impliquant deux types de DC, interviendraient dans l'ACG. Une première voie, impliquant des DC productrices d'IL-6, d'IL-23 et d'IL-1 $\beta$ , aboutirait à une polarisation Th17, à la production d'IL-17 qui activerait les cellules endothéliales, les CML et les fibroblastes. Cette voie serait inhibée par la corticothérapie. A l'inverse, une voie Th1 impliquant des DC productrices d'IL-12 et d'IL-18 aboutirait à la production d'IFN- $\gamma$  activant les macrophages (MP), les cellules endothéliales et les cellules cytotoxiques. Cette voie Th1, indépendante de la précédente, serait résistante à la corticothérapie et à l'origine des manifestations vasculaires chroniques de l'ACG [82,163].

A l'inverse des LTh1 et des LTh17 pro-inflammatoires, les Treg, définis par le phénotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> [164], ont un rôle immunosuppresseur et maintiennent l'homéostasie lymphocytaire. Jusqu'à nos travaux, aucune donnée n'était disponible dans la littérature concernant un possible défaut de réponse T régulatrice au cours de l'ACG. Ces résultats seront rapportés plus loin.

### *c) Le remodelage vasculaire*

Deux aspects de la physiopathologie de l'ACG expliquent les symptômes : l'intense réaction inflammatoire responsable des signes généraux et le remodelage vasculaire responsable des manifestations ischémiques de la maladie [165].

L'importante infiltration par des LTh1 et des LTh17 est responsable de la production de grandes quantités d'IL-17 et d'IFN- $\gamma$ . Le rôle de l'IL-17, cytokine plus récemment mise en évidence, est moins bien connu que celui de l'IFN- $\gamma$ . L'IFN- $\gamma$  active les MP recrutés dans la paroi artérielle. Cette activation chronique va entraîner la formation de cellules géantes multinucléées, caractéristiques de la maladie. CCL2, ligand de CCR2 semble jouer un rôle primordial dans le recrutement des MP au cours de l'ACG [166,167]. CCL2 est produite non seulement par les leucocytes infiltrant la paroi artérielle, notamment dans les lésions granulomateuses, mais aussi par les CML de la média [166]. L'hypothèse d'un rôle important de CCL2 dans la physiopathologie de l'ACG est confortée par la corrélation entre la survenue de rechutes au cours de la première année de suivi et le niveau d'expression de CCL2 dans la paroi artérielle [166].

Les MP situés dans l'adventice, stimulés par l'IFN- $\gamma$ , vont produire des cytokines inflammatoires, l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6, qui vont amplifier la réponse inflammatoire locale et être à l'origine des signes généraux de l'ACG : asthénie, fièvre, amaigrissement, anorexie et élévation des protéines de l'inflammation [19,116,137,168,169].

Les MP infiltrant la média, activés par l'IFN- $\gamma$ , vont synthétiser des composants délétères pour la paroi artérielle, notamment des radicaux libres dérivés de l'oxygène à l'origine de phénomènes de peroxydation lipidique, du monoxyde d'azote produit par la NO-synthase inductible et à l'origine de la nitration des protéines endothéliales et des métalloprotéases (MMP) à l'origine de la destruction de la matrice extra-cellulaire et de la fragmentation de la LEI [19,165]. Les MMP sont des enzymes protéolytiques capables de digérer l'élastine et sont à l'origine de la destruction de la média. Seules les MMP-2 et MMP-9 sont détectées dans la paroi des artères affectées d'ACG, principalement au niveau des MP et des cellules géantes situés dans les granulomes à proximité de la LEI [170-172]. Dans une large étude comparant 50 BAT de sujets atteints d'ACG à 97 BAT normales, seule la

MMP-9 était associée à la fragmentation de la LEI, l'hyperplasie intimale et la sténose de la lumière vasculaire alors que la MMP-2 était détectée de façon identique entre les deux groupes [173].

Les MP activés par l'IFN- $\gamma$  et les cellules géantes vont également produire des facteurs de croissance : le *platelet-derived growth factor* (PDGF) et le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) [174]. Le PDGF provoque l'activation et la prolifération des CML à l'origine de l'hyperplasie intimale. Le VEGF aboutit à une importante néovascularisation favorisant le recrutement de nouvelles cellules immunitaires dans la paroi artérielle [175].

Les CML de la média sont des composants majeurs de la paroi artérielle. Elles ont une fonction contractile et participent aux phénomènes de réparation tissulaire grâce à leur capacité de migration et de prolifération [158]. Au cours de l'ACG, les MP et les LT s'accumulent dans la média où les CML constituent la cible directe des médiateurs toxiques produits par les LT et les MP. Les CML ne sont pas seulement des cibles du processus inflammatoire mais participent activement à sa génération et à son entretien : les CML de la média et celles qui ont migré et proliféré dans l'intima produisent des MMP-2 et MMP-9, à l'origine de la destruction de la média et de la fragmentation de la LEI [158,176].

Les phénomènes de néoangiogenèse et d'hyperplasie intimale sont directement responsables des manifestations ischémiques de la maladie [175]. Les *vasa vasorum*, normalement confinés à l'adventice, sont également présents dans la média et l'intima au cours de l'ACG et leur présence est corrélée avec la fragmentation de la LEI et la présence de cellules géantes. En effet, les facteurs de croissance produits par les MP et les cellules géantes (PDGF et VEGF) favorisent la prolifération et la migration des CML vers l'intima, à l'origine des phénomènes de néoangiogenèse et d'hyperplasie intimale [174]. La MMP-9 est détectée au niveau des CML de la média et joue probablement un rôle fondamental dans les processus d'invasion de l'intima par les CML, en facilitant la destruction de la LEI et la dissociation des CML [158].

Les cellules endothéliales, qui constituent une barrière entre le compartiment sanguin et les tissus, jouent un rôle crucial dans la régulation de la vasomotricité, de l'hémostase, de l'angiogenèse et des phénomènes inflammatoires. Les molécules

produites par les LT et les MP au cours de l'ACG agissent sur les cellules endothéliales qui sécrètent à leur tour des cytokines et expriment des molécules d'adhésion qui vont contribuer au recrutement de cellules immunitaires. En effet, l'analyse des *vasa vasorum* et des néovaisseaux issus de BAT de patients affectés d'ACG a mis en évidence une forte expression de molécules d'adhésion ICAM-1, ICAM-2, P-selectine, E-sélectine et VCAM-1 par les leucocytes et les cellules endothéliales [177]. De plus, la concentration sérique d'ICAM-1 soluble est corrélée à l'activité de l'ACG [178].

#### d) Le rôle de la réponse immunitaire humorale

Dans une moindre mesure que la réponse immunitaire à médiation cellulaire, il est possible que la réponse immunitaire humorale soit également impliquée dans la physiopathologie de l'ACG. En effet, quelques lymphocytes B sont parfois détectés dans les BAT de patients atteints d'ACG, en particulier dans l'adventice (figure 1H) [160,179,180] où ils sont associés à des plasmocytes, notamment chez les patients ayant une atteinte visuelle [181]. Témoignant du possible rôle de l'immunité humorale, la présence de différents types d'auto-anticorps a été rapportée au cours de l'ACG mais sans que leurs rôles pathogéniques soient clairement démontrés. Ainsi, des anticorps anti-cardiolipines (aCL) ont été détectés chez 20 à 50% des patients affectés d'ACG, mais à taux faible, sans anticorps anti- $\beta$ 2glycoprotéine I et sans association avec une augmentation du risque ischémique [61-65]. Ces aCL disparaissent après 3 mois de corticothérapie [65,66]. Des anticorps anti-cellules endothéliales (aCE) ont été détectés chez 33% des patients atteints d'ACG [67]. Ces aCE ne sont pas spécifiques de l'ACG car ils ont été aussi retrouvés chez des sujets sains [68] ou atteints de maladie auto-immune [69]. Cependant, au cours de l'ACG, ces aCE seraient des IgG dirigées contre des auto-antigènes spécifiques exprimés par les cellules endothéliales et les CML, tels que la vinculine, la lamine A/C, l'annexine V, le VDCA-2 (*voltage dependent anion-selective channel protein 2*) et d'autres protéines impliquées dans le métabolisme énergétique cellulaire [70]. Plus récemment, des anticorps dirigés contre la chaîne lourde de la ferritine humaine ont été détectés chez 92% des patients affectés d'ACG ou de PPR non traitée, mais aussi chez 29% des patients affectés de lupus et seulement 1% des sujets sains



[71]. Ces données n'ont pas été confirmées dans une cohorte française puisque ces anticorps étaient détectés chez 72,5% des patients atteints d'ACG à BAT positive, 41,3% en cas de BAT négative, 2,5% des sujets sains mais également 31,9% de patients chez qui le diagnostic d'ACG n'était pas retenu [72].

#### e) Le rôle des polynucléaires neutrophiles

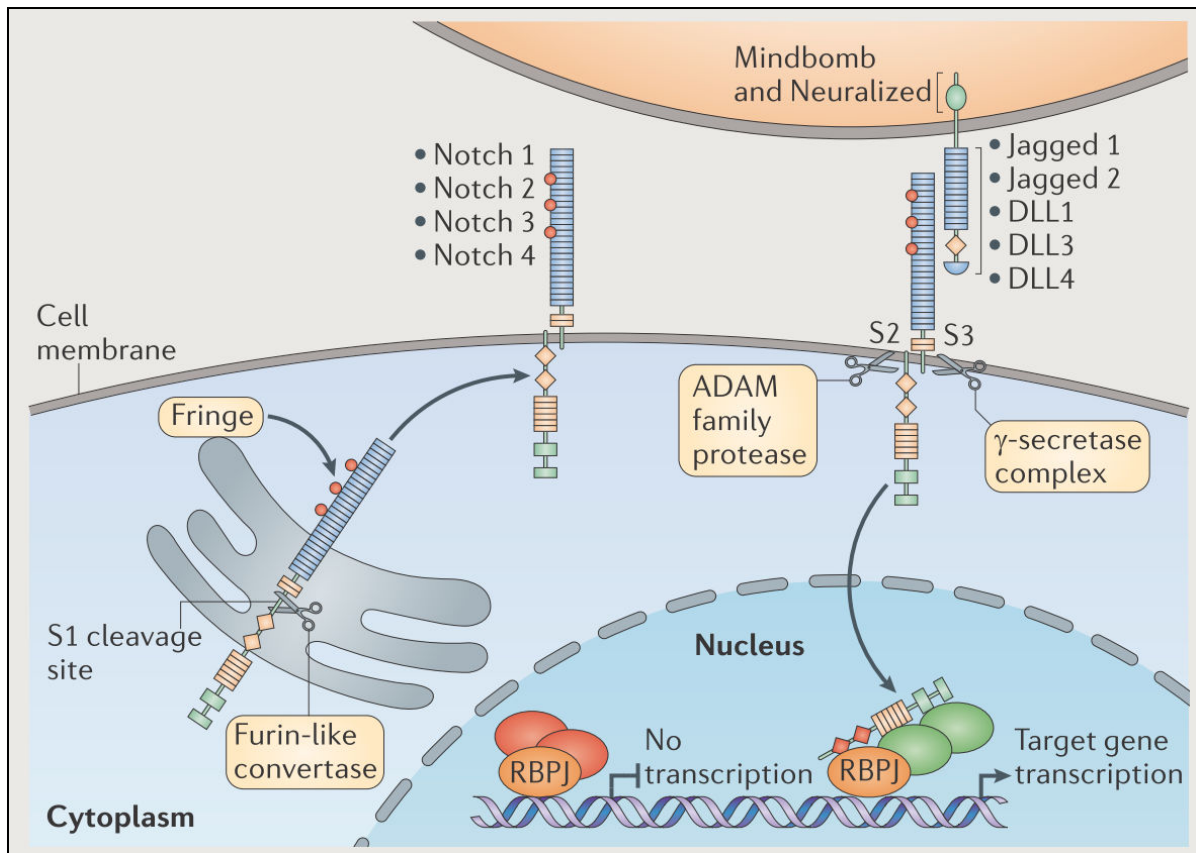
Les lymphocytes Th17, impliqués dans la physiopathologie de l'ACG [82-84], sont caractérisés par leur capacité à produire de l'IL-17, une cytokine pro-inflammatoire qui, parmi d'autres fonctions, augmente le recrutement, l'activation et la migration des polynucléaires neutrophiles (PNN) et des MP via la stimulation de la granulopoïèse et la synthèse de chémokines (CXCL1, CXCL6, CXCL8, CXCL10, CCL2, CINC [*Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant*]) par les PNN, MP et cellules épithéliales activées par l'IL-17 [182,183]. Si beaucoup de données sont disponibles concernant le rôle des MP dans l'ACG, ce n'est pas le cas pour les PNN. Une étude récente est en faveur d'un probable rôle des PNN au cours de la physiopathologie de l'ACG. Au diagnostic, les PNN ont un phénotype activé ( $CD16^{\text{high}}$  Annexine A1 [ $AnxA1$ ] $^{\text{high}}$   $CD62L^{\text{low}}$   $CD11b^{\text{high}}$ ) alors qu'une semaine après le début du traitement, c'est-à-dire lorsque les patients reçoivent de fortes doses de corticoïdes, le nombre de PNN circulants est stable mais leur phénotype modifié ( $CD16^{\text{high}}$   $AnxA1^{\text{high}}$   $CD62L^{\text{low}}$   $CD11b^{\text{low}}$ ) et avec une faible capacité d'adhésion aux cellules endothéliales. Après 24 semaines de traitement, alors que la dose de corticoïdes a été diminuée, le phénotype des PNN circulants se modifie ( $CD16^{\text{high}}$   $AnxA1^{\text{high}}$   $CD62L^{\text{high}}$   $CD11b^{\text{high}}$ ), ce qui est corrélé à une forte capacité d'adhésion aux cellules endothéliales. Dans cette étude, les auteurs ont également mis en évidence une sous-population de PNN, caractérisée par un phénotype  $CD16^{\text{high}}$   $CD62L^{\text{low}}$   $CD11b^{\text{high}}$ , et ayant la capacité d'inhiber la prolifération et l'activation des LT. Cette sous-population régulatrice de PNN est deux fois plus fréquente lorsque les doses de corticoïdes sont fortes (1 semaine après le début du traitement) que lorsque la corticothérapie est prescrite à faible dose (24 semaines après le début du traitement). Les auteurs émettent donc l'hypothèse que la diminution de cette population régulatrice de PNN lors du sevrage de la

corticothérapie pourrait avoir un rôle dans la survenue des rechutes de la maladie [184].

*f) Interactions Notch-Notch ligands au cours de l'ACG*

Le dialogue entre les LT et les cellules hôtes de la paroi vasculaire (CML et cellules endothéliales) fait intervenir la voie de signalisation Notch, une voie de signalisation très conservée au cours de l'évolution qui a été identifiée pour la première fois chez les mouches [178] et qui intervient dans le développement des vertébrés, et notamment des structures vasculaires [179]. La signalisation par Notch joue un rôle clé dans le développement normal de nombreux tissus en régulant la différenciation, la survie, et/ou la prolifération, et chaque choix dépend essentiellement du contexte cellulaire. Les récepteurs Notch et leurs ligands (*Jagged* et *Delta*) sont des protéines transmembranaires. La liaison du récepteur Notch avec son ligand exprimé sur la cellule voisine provoque des événements protéolytiques qui conduisent à la translocation du domaine intracellulaire de Notch vers le noyau. Ce domaine y interagit avec des facteurs de transcription comme CSL, activant la transcription de gènes de type hélice-boucle-hélice comme HES-1. Ceux-ci induisent à leur tour l'expression de facteurs de transcription spécifiques de tissus qui vont réguler le destin de la cellule (figure 3) [185,186].

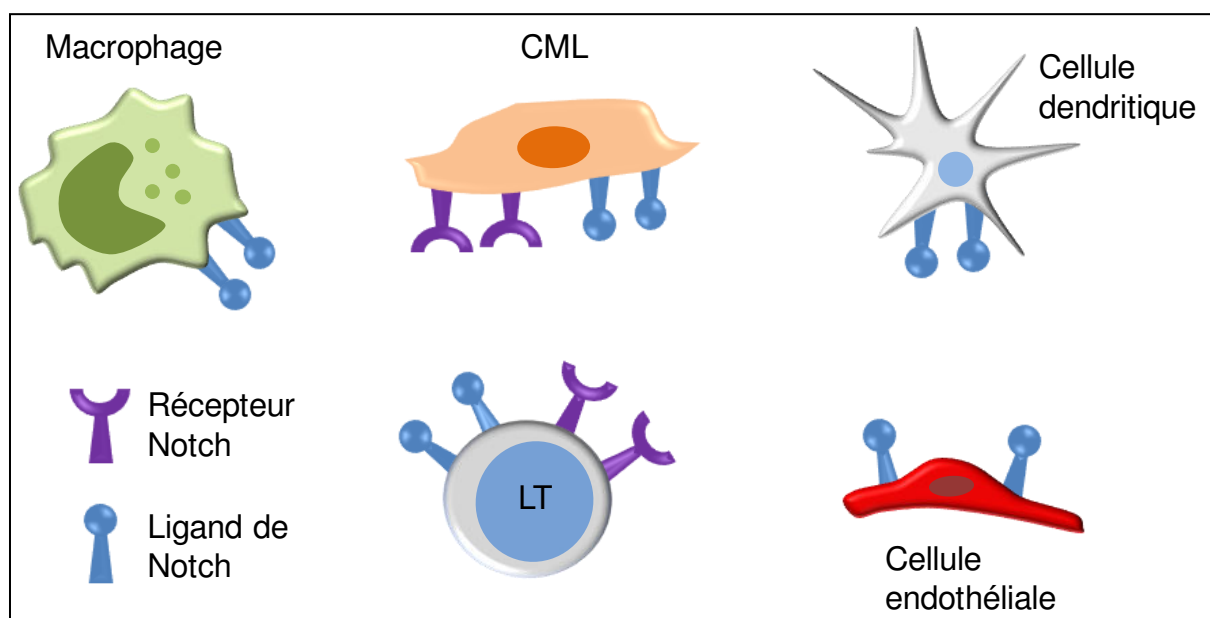
Au cours de l'hématopoïèse, la signalisation par Notch exerce un rôle majeur dans la survie, la prolifération, et/ou le choix de différenciation. Notch favorise l'autorenouvellement aux dépens de la différenciation, tandis qu'il oriente la différenciation du précurseur lymphoïde vers la lignée T aux dépens de la lignée B. De rares pathologies sont associées à des mutations dans les gènes codant pour les protéines impliquées dans la voie de signalisation de Notch : une leucémie aiguë lymphoblastique, le syndrome Cadasil et le syndrome d'Alagille. Ces trois pathologies sont associées à des mutations dans les gènes Notch1, Notch3 et Jagged1, respectivement [185,186].



**Figure 3 : Voie de signalisation Notch [186].** Les mammifères possèdent 4 récepteurs Notch (Notch 1-4) qui se lient à 5 ligands de la famille Jagged et Delta-like (Jagged 1 et Jagged 2, Delta-like ligand 1 (DLL1), DLL3 et DLL4). Dans l'appareil de Golgi, une convertase de type furine (*Furin-like convertase*) clive la protéine Notch néoformée, générant ainsi une molécule dimérique composée d'une partie extracellulaire et d'une partie transmembranaire. L'interaction entre Notch et son ligand provoque un changement conformationnel qui autorise une métalloprotéase de la famille ADAM (*ADAM family protease*) à effectuer un premier clivage dans la sous-unité transmembranaire. La partie extracellulaire de Notch est donc libérée et endocytée par les cellules voisines exprimant les ligands Jagged ou DLL. Un second clivage est réalisé via l'activité γ-sécrétase d'un complexe comprenant les présénilines et la nicastrine, ce qui permet de libérer la partie intracellulaire de Notch. Cette étape est l'étape limitante de la voie de signalisation Notch puisqu'elle peut être inhibée par des petites molécules inhibant l'activité γ-sécrétase. Une fois dans le noyau, la partie intracellulaire de Notch interagit avec les facteurs de transcription RBPJ (*recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region*), appelés facteurs de transcription CSL chez l'homme. Ceci a pour conséquence de déplacer les complexes répresseurs liés à CSL (RBPJ) et de recruter à la place des coactivateurs. Ces nouveaux complexes autorisent la transcription des gènes codant pour les protéines de type hélice-boucle-hélice comme HES qui vont à leur tour modifier la transcription de gènes spécifiques des lignées.

Dans les artères saines, de multiples récepteurs Notch et leurs ligands régulent la différenciation, la plasticité et le switch phénotypique des CML et facilite le dialogue entre CML et cellules endothéliales [187]. Dans les LT de patients affectés d'ACG, l'expression du récepteur Notch 1 est 20 fois plus élevée que chez des sujets sains, permettant à ces LT d'interagir avec des DC, MP, cellules endothéliales ou CML exprimant les ligands de Notch 1 [188] (Figure 4). Dans un modèle murin humanisé d'ACG, le blocage de la voie de signalisation Notch par un inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase supprime l'induction de la vascularite, via une puissante inhibition de l'activation des LT, des réponses Th17 et Th1, aussi bien lors de l'induction que lors de la phase d'état de la réponse inflammatoire [188].

Les CML et les cellules endothéliales peuvent exprimer à la fois des récepteurs Notch et leurs ligands [189] (Figure 4). De même, les LT CD4<sup>+</sup> expriment le récepteur Notch 1 et Jagged 2, un ligand de Notch [190]. Cela souligne l'existence d'un dialogue bidirectionnel entre les CML et les cellules endothéliales d'une part et les LT CD4<sup>+</sup> d'autre part [138,188]. Le fait que le blocage de la voie Notch supprime les lésions de vascularite dans un modèle d'ACG, souligne le rôle fondamental de cette voie de signalisation dans la pathogénie de l'ACG.



**Figure 4 : Interactions Notch-Notch ligand au cours de l'ACG (adapté de [138]).** Les LT CD4<sup>+</sup> des patients affectés d'ACG expriment spontanément le récepteur Notch 1 et un de ses ligands (Jagged 2), leur permettant d'interagir avec les cellules dendritiques, les macrophages, mais surtout les CML et les cellules endothéliales. CML : cellule musculaire lisse ; LT : lymphocyte T.

g) Le rôle du vieillissement dans la physiopathologie de l'ACG

L'âge constitue le principal facteur de risque de développer une ACG. Le processus de vieillissement s'accompagne d'une modification du système immunitaire inné et adaptatif et d'un remodelage de la paroi vasculaire [191]. Tous les acteurs cellulaires impliqués dans l'ACG sont affectés par le vieillissement : DC, LT, cellules endothéliales et CML [191]. Le vieillissement est responsable d'une diminution du nombre de LT naïfs et d'un enrichissement en LT mémoires et effecteurs, d'une diminution de la diversité du répertoire T et d'une accumulation de LT  $CD4^+CD28^-$  et  $CD8^+CD28^-$  qui sont des LT sénescents dont la fréquence est inversement corrélée à la réponse vaccinale [192-195]. Les DC sont également modifiées par le processus de vieillissement : l'expression des TLR est maintenue mais la réponse suite à leur stimulation est diminuée et la migration des DC vers les organes lymphoïdes secondaires est altérée [196,197]. Parallèlement, les sujets âgés sont davantage exposés aux infections : augmentation de la charge infectieuse et réactivation d'infections latentes virales ou bactériennes. Les cellules immunitaires survivant à ce processus de vieillissement sont moins bien régulées et produisent spontanément des cytokines. En effet, une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$ ) par les DC, les MP, les cellules endothéliales et les fibroblastes sénescents a été observée [191,198]. Ce phénomène, dénommé « *inflamm-aging* », serait à l'origine d'un état inflammatoire chronique facilitant le développement de maladies auto-immunes et de l'athérosclérose au cours du vieillissement. En effet, l'ACG est caractérisée par le développement d'une réaction immunitaire non contrôlée, médiée par les DC et les LT, dans un tissu normalement immunoprotégé qu'est la paroi artérielle. Avec le vieillissement, le tissu vasculaire subit des modifications (dégénérescence de la média, dépôts calciques, hyperplasie intimale, altération des fibres élastiques, altération des protéines de la matrice [199-202]) qui, combinées à cet état pro-inflammatoire, favoriseraient la présentation d'auto-antigènes aux LT par les DC et donc le déclenchement de l'ACG [191].

## **7. Objectifs**

La cause exacte de l'ACG demeure donc inconnue mais les mécanismes immunopathologiques aboutissant au remodelage vasculaire sont de mieux en mieux connus et permettent aujourd'hui d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques qui permettront peut-être de diminuer la dose et la durée de la corticothérapie reçue par ces malades, encore responsable d'une importante morbi-mortalité.

L'objectif de ce travail de Thèse était d'étudier la réponse immunitaire T CD4 et CD8 au cours de l'ACG ; d'identifier et décrire des déséquilibres dans l'homéostasie lymphocytaire T, notamment concernant le contrôle de la balance Th17/Treg au cours de l'ACG ; d'étudier l'effet du traitement de l'ACG sur l'homéostasie lymphocytaire T, par la corticothérapie qui en est le traitement de référence et par le tocilizumab qui est probablement le traitement d'avenir de l'ACG.

# ***RESULTATS***

# ETUDE DES LYMPHOCYTES T CD4 AU COURS DE L'ACG ET LA PPR

---

## **1. Introduction : polarisation de la réponse immunitaire T et lymphocytes T régulateurs**

### *a) Polarisation lymphocytaire T, réponse Th1 et Th2*

Les lymphocytes T (LT) CD4 représentent une population cellulaire hétérogène qui joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire adaptative. Cette réponse immunitaire élaborée, spécifique d'antigène, est importante dans tous les domaines de l'immunité : infection, hypersensibilité, auto-immunité, cancer et rejet de greffe. Au sein des lymphocytes T CD4, on distingue deux grands types de cellules : les lymphocytes T effecteurs dont la fonction principale est la défense contre les agents pathogènes, et les lymphocytes T régulateurs (Treg) qui protègent l'organisme des réponses dirigées contre des auto-antigènes ou contre des exo-antigènes lorsque ces dernières pourraient devenir dangereuses pour l'hôte. Ainsi, les Treg sont les garants de l'homéostasie de la réponse immunitaire [203].

En cas d'infection, les agents pathogènes peuvent être directement détruits par les cellules de la réponse immunitaire innée (polynucléaires, cellules *Natural Killer* [NK], macrophages) et/ou captés par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) qui vont présenter les antigènes (Ag) infectieux aux lymphocytes T (LT). Les LT qui vont reconnaître l'Ag vont s'activer s'ils reçoivent un second signal via des interactions moléculaires avec la CPA, en particulier via des molécules de costimulation telles que les interactions entre CD28 et CD80/86, CD154 et CD40 [204]. Les LT CD4<sup>+</sup> naïfs activés vont ensuite se différencier en divers types de LT ayant des fonctions effectrices distinctes, permettant de recruter différents types cellulaires pour *in fine*, éliminer l'agent pathogène responsable de l'agression initiale.



En 1986, Mossman et Coffman ont décrit chez la souris deux populations de LT CD4 : les LT « helper » 1 et 2 (Th1 et Th2) [205]. Ces données ont ensuite été confirmées chez l'Homme [206,207].

C'est l'environnement cytokinique, déterminé par le type de CPA et la nature du signal danger qu'elle perçoit [208], qui va orienter la différenciation du LT naïf (Th0) vers la voie Th1 ou Th2. Dans un environnement riche en IL-12, les lymphocytes NK vont produire de l'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ) qui va entraîner une activation de STAT-1 dans le LT CD4 naïf. L'activation de STAT-1 entraîne l'expression de T-bet, facteur de transcription spécifique des lymphocytes Th1. L'expression de T-bet entraîne la production d'IFN- $\gamma$  et l'augmentation de l'expression de la chaîne  $\beta 2$  du récepteur de l'IL-12 (IL-12R $\beta 2$ ) par les LT. Ainsi, les LT vont pouvoir être activés par l'IL-12, ce qui entraîne l'activation de STAT-4 qui entretient l'expression de l'IL-12R $\beta 2$  et provoque la production de grandes quantités d'IFN- $\gamma$  par le LT, désormais polarisé en lymphocyte Th1 [203,209]. Au stade ultime de la différenciation Th1 et grâce à l'activation de la voie IL-12/STAT-4, le LT exprime également la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-18 (IL-18R $\alpha$ ). L'action conjointe de l'IL-12 et de l'IL-18 permet alors d'induire la production d'IFN- $\gamma$  par le lymphocyte Th1 sans activation de son TCR, ce qui joue probablement un rôle dans la chronicisation de la réponse inflammatoire [210,211]. Les lymphocytes Th1 sont principalement impliqués dans la réaction immunitaire à médiation cellulaire : ils conduisent à l'activation des LT cytotoxiques et des macrophages qui participent à la réaction immunitaire antitumorale, antivirale et contre les bactéries intracellulaires. De plus, chez l'Homme, les lymphocytes Th1 induisent une commutation de classe vers la production d'IgM, d'IgG<sub>1</sub>, d'IgG<sub>2</sub> et d'IgG<sub>3</sub>, alors que les lymphocytes Th2 induisent la production d'IgM, d'IgG<sub>4</sub> et d'IgE [203].

Les lymphocytes Th1 sont fortement impliqués dans la physiopathologie de l'ACG. L'IFN- $\gamma$  qu'ils produisent induit en effet l'activation des monocytes/macrophages et aboutit à la formation de cellules géantes et au remodelage vasculaire caractéristique de l'ACG [19,137,138,147,148,158].

Dans un milieu riche en IL-4, les lymphocytes Th0 se différencient en Th2. S'il est clairement démontré que l'IL-4 est indispensable à la polarisation Th2, les mécanismes responsables de sa production aux stades précoces de la

différenciation Th2 sont plus flous. Il a été démontré que le LT naïf pouvait lui-même produire de l'IL-4 via une interaction entre Notch (exprimé par le LT) et Jagged-1 (exprimé par la DC) [212-214], ou via l'effet de l'IL-25 produite par le mastocyte ou le macrophage [215,216]. Plus récemment, 3 groupes ont indépendamment démontré que la DC n'était pas nécessaire à l'induction d'une réponse Th2 par des allergènes, des helminthes ou des complexes Ag/IgE. En réalité, ce sont les polynucléaires basophiles (PNB) qui jouent le rôle de CPA au cours de la réponse Th2. Ils expriment le CMH-II et les molécules de costimulation CD80/86, produisent de l'IL-4 et sont capables d'activer des LT naïfs et de les polariser en lymphocyte Th2 en l'absence de DC [217-221].

L'interaction de l'IL-4 avec son récepteur sur le LT naïf entraîne l'activation de STAT-6 puis l'expression de GATA-3, facteur de transcription spécifique des lymphocytes Th2. GATA-3 se lie aux régions promotrices des gènes de l'IL-4 et l'IL-13 mais ne suffit pas à induire leur sécrétion, qui nécessite l'activation conjointe de STAT-5 via la signalisation de l'IL-2. L'IL-2 et l'IL-4 sont donc les deux cytokines clés de la différenciation Th2 [203,222,223].

Les lymphocytes Th2 produisent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-9 et de l'IL-13 et sont impliqués dans la réponse immunitaire antiparasitaire [224]. L'IL-4 et l'IL-13 induisent la production d'IgE par les plasmocytes [225]. Les IgE se lient ensuite au récepteur de type I du fragment Fc des IgE (FcεRI) sur les PNB et les mastocytes dont l'interaction avec leurs ligands induit un *crosslinking* des récepteurs provoquant la libération de médiateurs tels l'histamine, la sérotonine et des cytokines (IL-4, IL-13, TNF-α et éotaxine). L'IL-5 stimule l'éosinophilie, l'activation et la survie des polynucléaires éosinophiles (PNE) [226]. L'IL-9 stimule la réponse mastocytaire et la production d'IgE lors de la réponse antiparasitaire et induit la production de mucines par les cellules épithéliales [227].

D'un point de vue physiopathologique, les lymphocytes Th2 sont impliqués dans l'allergie [228]. Au cours de l'ACG, il n'y a pas de démonstration d'une implication de la réponse Th2 [203,229].

Il existe une régulation mutuelle entre les réponses Th1 et Th2 : l'IFN-γ inhibe la polarisation Th2 et l'IL-4 la polarisation Th1. De plus, cette régulation est assurée par les facteurs de transcription spécifiques de la voie Th1 et Th2. GATA-3 diminue

l'expression de STAT-4 [230], T-bet supprime l'expression de GATA-3 [231] et STAT-5 inhibe l'expression de T-bet [222].

Cette dualité Th1/Th2 fut bouleversée en 2005 avec la description d'une nouvelle population lymphocytaire T CD4 : les lymphocytes Th17, caractérisés par leur capacité à produire une cytokine fortement pro-inflammatoire, l'IL-17 [232,233]. Les travaux réalisés sur les Th17 ont montré leur implication dans la réponse immunitaire anti-infectieuse (notamment vis-à-vis des bactéries extracellulaires et des champignons) et aussi dans plusieurs pathologies dysimmunitaires telles que la polyarthrite rhumatoïde (PR), la sclérose en plaques (SEP), le psoriasis, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, l'asthme [234-239] et plus récemment l'ACG [82,84].

Dans les modèles expérimentaux de PR, comme celui de l'arthrite au collagène, l'IFN- $\gamma$  était jusque là considéré comme ayant un rôle pathogène [240,241], même si certains travaux contradictoires attribuaient à l'IFN- $\gamma$  un effet protecteur [242,243]. L'IFN- $\gamma$  est produit par les lymphocytes Th1, qui se différencient grâce à l'action de l'IL-12. Les travaux réalisés montraient que la production d'IL-12, élément clé dans cette activation, était très augmentée. En réalité, il existait une confusion entre l'IL-12 et l'IL-23. Ces 2 cytokines sont des hétérodimères composés de deux sous-unités : p35 et p40 pour l'IL-12, p19 et p40 pour l'IL-23 [244]. Or, les dosages qui étaient supposés montrer une élévation de l'IL-12 ciblaient la partie commune à ces 2 cytokines, la sous-unité p40. D'autres études ont alors confirmé le rôle princeps de l'IL-23 en montrant que les souris déficientes en p40 ou p19 étaient protégées de l'arthrite au collagène alors que les souris déficientes en p35, l'autre sous-unité de l'IL-12, développaient des arthrites plus sévères. Ainsi, l'arthrite au collagène n'est pas due à une réaction immunitaire de type Th1 via l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  mais de type Th17 via l'IL-23 [245]. A l'inverse, l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  ont plutôt un effet protecteur en inhibant la production d'IL-17 [238].

#### *b) Les lymphocytes Th17*

##### **Genèse des lymphocytes Th17 chez la souris**

Plusieurs cytokines jouent successivement un rôle dans la différenciation et l'expansion des lymphocytes Th17 chez la souris. Tout d'abord, un environnement cytokinique riche en IL-6 et *transforming growth factor-bêta* (TGF- $\beta$ ) va induire la

différenciation des Th0 en Th17, phénomène amplifié en présence de cytokines inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-18 et le TNF- $\alpha$  [246,247]. La présence d'IL-6 et de TGF- $\beta$  est indispensable à la différenciation Th17 comme cela a été montré *in vitro* et *in vivo* en utilisant des modèles animaux dont les gènes pour ces 2 cytokines avaient été invalidés. L'IL-6 est une cytokine ubiquitaire produite par de nombreuses populations cellulaires, notamment les cellules de l'immunité innée, les lymphocytes B et certaines sous-populations de lymphocytes T. Le TGF- $\beta$  est produit par certaines lignées de leucocytes et les cellules stromales. Une sécrétion autocrine ou paracrine de TGF- $\beta$  par les lymphocytes T, notamment les Th17 ou les Treg, est importante pour la différenciation Th17 [246,248,249]. De plus, le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  augmentent la différenciation Th17 médiée par l'IL-6 et le TGF- $\beta$  [246].

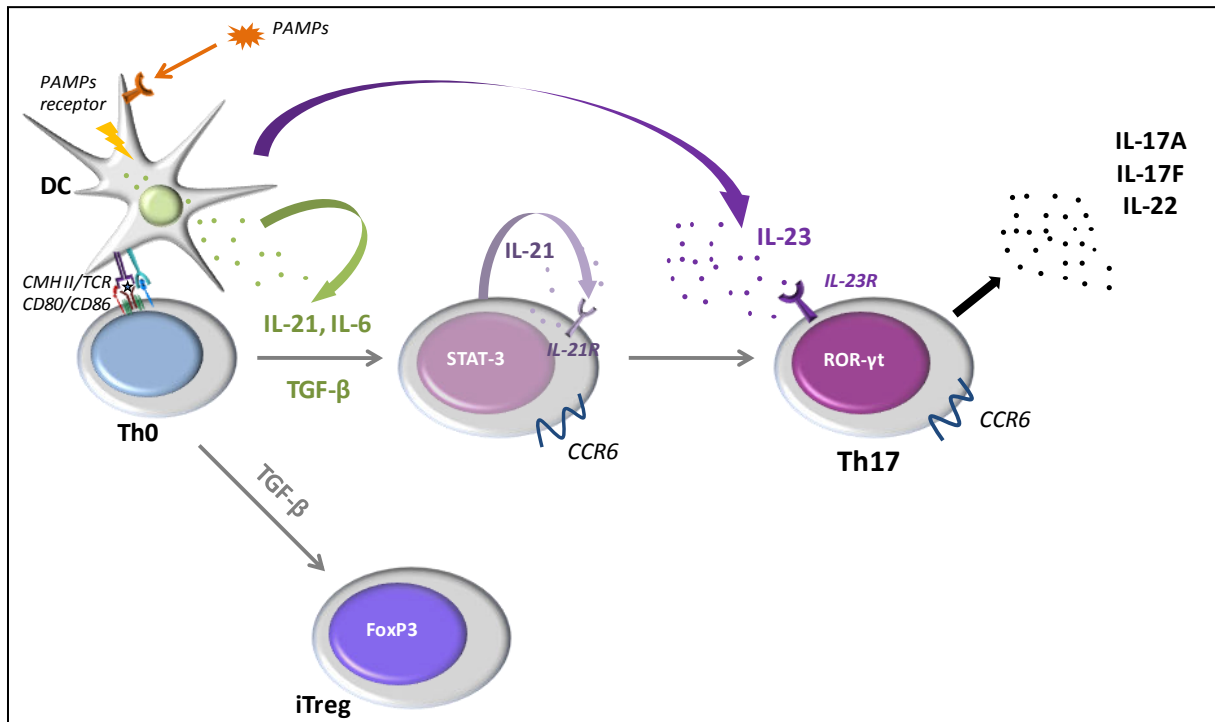
Cependant, les souris déficientes pour le gène de l'IL-6 sont encore susceptibles à l'encéphalite auto-immune expérimentale qui est le modèle murin de la SEP et qui dépend de la voie Th17. En fait, l'IL-21, produite par les lymphocytes NK, NKT ou Th17, est capable, en synergie avec le TGF- $\beta$  d'induire la différenciation de LT naïfs vers la voie Th17 [250-254].

L'IL-6 et le TGF- $\beta$  ou l'IL-21 et le TGF- $\beta$  initient donc la différenciation Th17. La réponse Th17 est ensuite amplifiée par une sécrétion autocrine d'IL-21 par les lymphocytes Th17, ce qui entraîne l'expression de CCR6, récepteur de la chémokine CCL-20, du récepteur de l'IL-23 (IL-23R) et du facteur de transcription ROR- $\gamma$ t. Ensuite, l'IL-23 sécrétée par les macrophages et les cellules dendritiques stimulés par les cytokines inflammatoires (IL-1 $\beta$  et IL-6) permet la stabilisation et l'expansion de la lignée cellulaire Th17 en se fixant à l'IL-23R exprimé par les lymphocytes Th17. La liaison IL-23/IL-23R va induire la sécrétion des cytokines caractéristiques des Th17 : IL-17A, IL-17F et IL-22 [255,256].

Malgré ces données démontrant le rôle majeur du TGF- $\beta$  dans la différenciation Th17, il a récemment été mis en évidence que des lymphocytes Th17 étaient présents chez des souris dont la signalisation du TGF- $\beta$  était déficitaire [252,257]. Ces lymphocytes Th17, générés en l'absence de TGF- $\beta$  expriment à la fois ROR- $\gamma$ t et T-bet et correspondent probablement à la population Th1/Th17, mieux décrite chez l'Homme, et dont l'existence souligne la plasticité qu'il existe entre ces sous-populations lymphocytaires [252,258].

Le principal facteur de transcription des lymphocytes Th17 est *le retinoic acid-related orphan receptor- $\gamma$ t* (ROR- $\gamma$ t), produit du gène RORc. Via STAT-3, il stimule la synthèse d'IL-17A et F. D'autres facteurs de transcription comme ROR- $\alpha$ , IRF4 (*Interferon Regulatory Factor 4*) et AHR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*) jouent un rôle synergique avec ROR- $\gamma$ t dans la différenciation Th17 mais ce dernier reste néanmoins le facteur de transcription le plus spécifique de la lignée Th17 [259,260].

Il existe chez la souris une dichotomie entre les Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>), cellules immunosuppressives, et les lymphocytes Th17 qui sont pro-inflammatoires. La présence de TGF- $\beta$  seul dans l'environnement cellulaire induit la génération de Treg, tandis qu'associé à de l'IL-6, apparaissent des Th17 (figure 5). De plus, le facteur de transcription FoxP3, spécifique des Treg est capable d'inhiber le facteur de transcription des Th17, ROR- $\gamma$ t [248]. Cette dichotomie entre Treg et Th17 pourrait être très importante dans la genèse des maladies auto-immunes et n'avait pas jusqu'à présent été étudiée au cours de l'ACG.



**Figure 5 : La différenciation des Th17 et la dichotomie Th17/Treg**

Après activation par une cellule dendritique (DC), les lymphocytes T naïfs (Th0) se différencient en Th17 sous l'action conjointe de l'IL-21 ou de l'IL-6 associée au TGF-β. Une boucle d'amplification est ensuite réalisée grâce à la sécrétion autocrine d'IL-21. Enfin, l'IL-23 permet la stabilisation et l'expansion de la lignée cellulaire Th17 en agissant sur le récepteur membranaire de l'IL-23 (IL-23R) exprimé par les lymphocytes Th17 et induit la sécrétion d'IL-17A, IL-17F et IL-22. Le facteur de transcription principal des lymphocytes Th17 est ROR-γt (produit du gène RORC) qui provoque, via STAT-3, la synthèse d'IL-17 A et F. La sécrétion d'IL-21 induite par l'IL-6 et le TGF-β est entièrement dépendante de STAT-3. Les lymphocytes Th17 expriment à leur surface CCR6, récepteur de la chémokine CCL20 qui permet le recrutement des Th17 sur le site de la réponse inflammatoire. En présence de TGF-β sans IL-6 dans l'environnement cellulaire, les lymphocytes Th0 se différencient en Treg induits (iTreg).

**IL** : interleukine; **FoxP3** : forkhead/winged-helix box protein 3; **Th** : (lymphocyte) T helper (auxiliaire) ; **ROR-γt** : retinoic acid-related orphan receptor-γt; **STAT** : signal transducer and activator of transcription; **TGF-β** : transforming growth factor-β.

## **Différenciation et phénotype des lymphocytes Th17 chez l'homme**

A l'inverse de ce que laissaient supposer les premiers travaux, les facteurs induisant la polarisation Th17 chez l'homme ne sont pas différents de ceux impliqués chez la souris [252].

Il a en effet été montré que les lymphocytes T naïfs humains ne se différenciaient pas en Th17 en présence d'IL-6 et de TGF- $\beta$  [261], la présence d'IL-6 et de TGF- $\beta$  étant capable d'induire l'expression de ROR- $\gamma$ t mais pas de sécrétion d'IL-17 [262]. Il avait été alors supposé que le TGF- $\beta$  n'interviennait pas dans la différenciation Th17 et qu'une combinaison d'IL-1 $\beta$  et d'IL-23 avec ou sans IL-6 induisait, chez l'homme, une polarisation Th17 [239,261]. En réalité, ces études étaient biaisées par la présence de faibles quantités de TGF- $\beta$  endogène, notamment dans les plaquettes ou le sérum ajouté au milieu de culture. Il a alors été démontré que le TGF- $\beta$  était indispensable à la différenciation Th17 chez l'homme [256,263,264].

Le TGF- $\beta$  est donc essentiel à l'induction de l'expression de RORC mais à forte concentration, il en inhibe l'expression. La présence de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-21, l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-23 inhibe cette répression de RORC et induit l'expression du gène de l'IL-17 [256,263,264]. Les lymphocytes T naïfs n'expriment pas IL-1R et IL-23R, qui sont induits sous l'effet du TGF- $\beta$  et de l'IL-6 ou l'IL-21 [256,263-265].

Chez l'Homme, le TGF- $\beta$  et l'IL-21 sont donc indispensables à l'induction de la polarisation Th17 puis l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-23 sont importantes pour l'amplification et l'expansion des lymphocytes Th17 différenciés et mémoires [252,256]. Le rôle du TGF- $\beta$  semble en fait être indirect, via une inhibition de T-bet et de la réponse Th1, qui favorise l'émergence de lymphocytes Th17 en présence de cytokines pro-inflammatoires [203,258,266].

RORC est le principal facteur de transcription des lymphocytes Th17 chez l'Homme. L'expression de RORC dans des LT naïfs induit la production d'IL-17A, IL-17F et IL-26, l'expression de CCR6 et inhibe la production d'IFN- $\gamma$  [258,263]. Comme chez la souris, STAT-3 est également indispensable à la différenciation Th17 chez l'homme et son rôle est souligné par le syndrome hyper IgE, un déficit immunitaire lié

à un déficit en STAT-3 qui est responsable d'un déficit de la réponse Th17 aboutissant à des infections bactériennes et fongiques à répétition [258,267,268].

D'un point de vue phénotypique, les lymphocytes Th17 humains et murins expriment les récepteurs de l'IL-6, du TGF- $\beta$ , de l'IL-23, de l'IL-21, de l'IL-1 $\beta$ , les récepteurs de chémokines CCR2, CCR4 et CCR6 (mais pas CXCR3 et CCR5), les facteurs de transcription RORC et STAT-3 et produisent de l'IL-17A, de l'IL-17F, de l'IL-21, de l'IL-22, de l'IL-26 et du CCL-20 [252,258]. De plus, les lymphocytes Th17 humains expriment spécifiquement CD161 et IL411 (*Interleukin-4-Induced gene 1*) [258].

CD161 est une glycoprotéine qui correspond au *NK cell receptor-P1* (NKRP1), récepteur exprimé par les lymphocytes NK chez le rongeur. Chez l'Homme, CD161 est exprimé par la majorité des cellules NK et certains LT CD4 et CD8 présents dans le thymus, le sang périphérique et de cordon ombilical [203,258,269,270]. Bien que tous les LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> ne soient pas capables de se différencier en Th17, les lymphocytes Th17 humains qui produisent de l'IL-17A et expriment RORC, expriment aussi le marqueur CD161 [265].

Les LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> expriment de manière constitutive RORC et IL-23R. Ils peuvent se différencier en Th1, Th2, ou Th17, mais aussi en Treg [271], en fonction des cytokines présentes dans leur environnement [265]. La présence combinée d'IL-23 et d'IL-1 $\beta$  favorise leur différenciation en Th1 ou Th17. L'ajout de TGF- $\beta$  inhibe l'expression de T-bet mais pas de RORC et ainsi, seuls des Th17 sont générés [159,266]. Le TGF- $\beta$  ne provoque donc pas directement la différenciation en Th17 mais y joue un rôle indirect en inhibant la polarisation vers la voie Th1. A l'inverse, les LT CD4 qui n'expriment pas CD161 sont incapables de se différencier en Th17, même en présence d'IL-23 et d'IL-1 $\beta$ .

De plus, il existe chez l'homme une population double positive (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> et IL-17<sup>+</sup>), baptisée Th1/Th17, qui se différencie en présence d'IL-12 et qui partage les caractéristiques phénotypiques des Th1 et des Th17 : production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-17, expression conjointe de RORC et T-bet, expression de IL-12R $\beta$ 1, IL-23R, IL-1R, CCR6 et CXCR3. Ces cellules reflètent l'importante plasticité qu'il existe entre les sous-populations Th1 et Th17. En présence d'IL-12, ces deux populations produisent de l'IFN- $\gamma$  en plus de l'IL-17 avec une augmentation de l'expression de T-bet et une



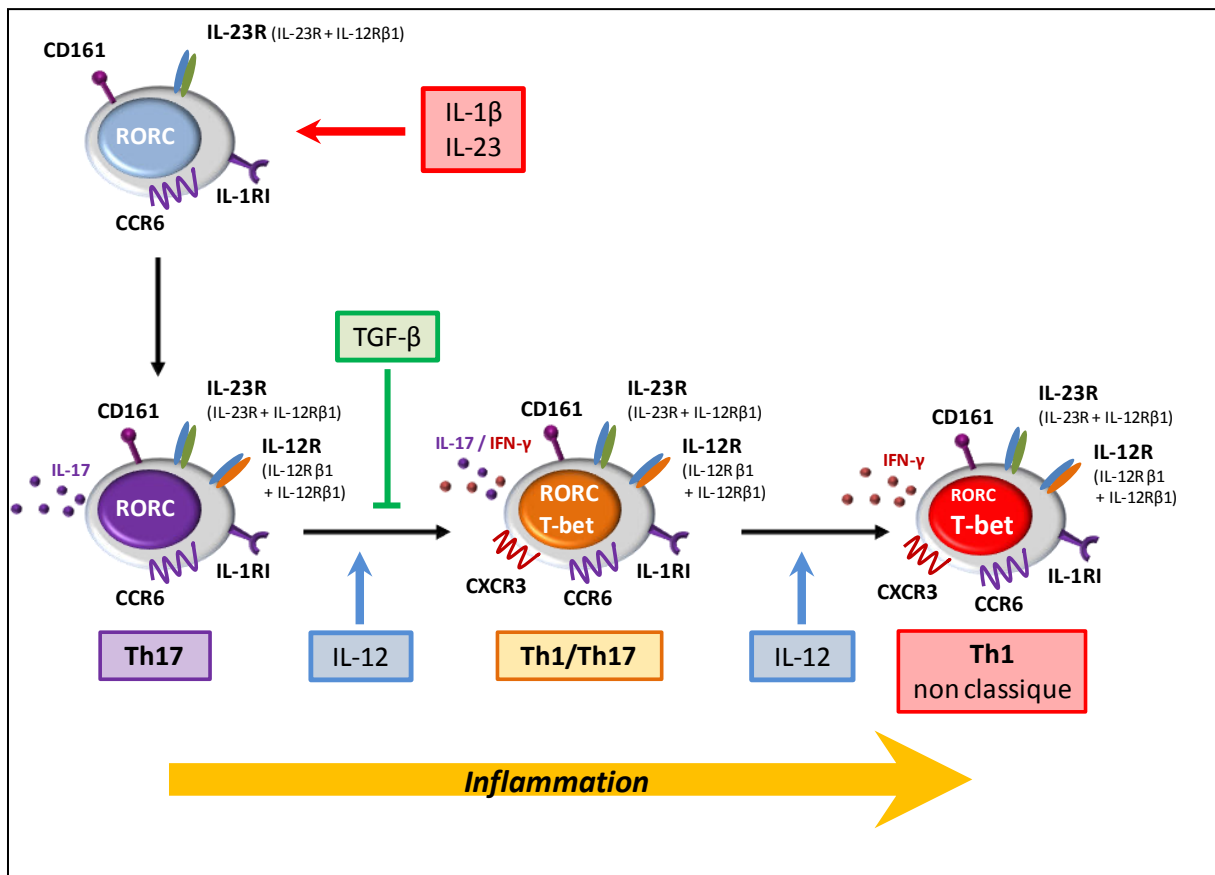
diminution de l'expression de RORC [269]. Progressivement et sous l'action de l'IL-12, ces lymphocytes Th1/Th17 ne vont plus produire que de l'IFN- $\gamma$  et devenir des lymphocytes Th1 « non classiques ». A l'inverse des lymphocytes Th1 classiques, les Th1 non classiques expriment aussi des marqueurs phénotypiques de la lignée Th17 tels que CD161, CCR6, IL-23R et RORC. Après un stade de différenciation intermédiaire (Th1/Th17), l'action de l'IL-12 aboutit progressivement à l'extinction de l'expression de l'IL-17 pour ne produire plus que de l'IFN- $\gamma$  [258,272,273] (figure 6, tableau 2).

En fait, plus qu'une population de précurseurs des lymphocytes Th17, les LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> constituent donc un marqueur phénotypique des lymphocytes Th17, Th1/Th17 ou du passage par un stade de différenciation Th17 des lymphocytes Th1 non classiques [258,265,274].

La fonction exacte de CD161 est inconnue. Il est suggéré que CD161 soit impliqué dans la diapédèse des lymphocytes T et NK [275]. Les lymphocytes T CD4 et CD8 exprimant le CD161 semblent se concentrer au niveau du tube digestif et du foie [258,273]. Chez l'homme, le ligand de CD161 est LLT1 (*lectin-like transcript 1*) qui est exprimé par les CPA et les lymphocytes. L'interaction en LLT1 et CD161 inhibe la production d'IFN- $\gamma$  chez les cellules NK et l'augmente chez les LT [276,277].

**Tableau 2 : Caractéristiques phénotypiques des lymphocytes Th17, Th1 classiques et Th1 non classiques** (adapté de [258])

	Th17	Th1 classiques	Th1 non classiques
<i>Origine</i>	Précurseurs thymiques CD161 <sup>+</sup> RORC <sup>+</sup>	Lymphocytes T naïfs CD161 <sup>-</sup>	- Lymphocytes Th17 - Précurseurs thymiques CD161 <sup>+</sup> RORC <sup>+</sup>
<i>Cytokines impliquées dans la polarisation</i>	IL-1 $\beta$ et IL-23	IL-12	IL-1 $\beta$ , IL-23 et IL-12
<i>Sites de maturation</i>	Tissus lymphoïdes des muqueuses	Ganglions	Sites inflammatoires
<i>Récepteurs de chémokines</i>	CCR6, CCR4	CXCR3	CXCR3 <sup>high</sup> CCR6 <sup>low</sup>
<i>Récepteurs de cytokines</i>	IL-1 $\beta$ R, IL-23R, IL-12R	IL-12R	IL-1 $\beta$ R, IL-23R, IL-12R
<i>Expression de CD161</i>	+++	-	+++



**Figure 6 : Polarisation des LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>**

Les LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> expriment de manière constitutive RORC, IL-1RI et le récepteur de l'IL-23 (IL-23R) qui est un hétérodimère constitué des chaînes IL-23R et IL-12Rβ1. La présence combinée d'IL-23 et d'IL-1β favorise la différenciation des LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> en Th17, caractérisés par la production d'IL-17, l'expression de CCR6 et CD161 et l'expression du récepteur de l'IL-12 (IL-12R), ce dernier étant un hétérodimère constitué des chaînes IL-12Rβ1 et IL-12Rβ2. L'ajout de TGF-β inhibe l'expression de T-bet mais pas de RORC et ainsi, seuls des Th17 sont générés. En présence d'IL-12, l'expression de T-bet augmente et celle de RORC diminue et les lymphocytes Th17 se différencient en Th1/Th17 (producteur d'IL-17 et d'IFN-γ) puis en Th1 non classiques qui produisent de l'IFN-γ sans IL-17 et expriment des marqueurs de la lignée Th1 (CXCR3 et T-bet) et Th17 (CD161, CCR6 et RORC). **IL** : interleukine; **Th** : (lymphocyte) T helper ; **RORC** : retinoic acid-related orphan receptor C ; **T-bet** : T-box expressed in T cells.

IL4I1 est une phénylalanine oxydase qui, chez l'homme, est exprimée par les lymphocytes Th17 à l'inverse des Th1. Dans les lymphocytes Th17, IL4I1 réduit l'expression des chaînes CD3ε et CD3ζ du TCR, ce qui inhibe la voie de signalisation du TCR, diminue la production d'IL-2 et limite donc la prolifération des lymphocytes Th17. La production d'IL4I1 est induite par RORC qui induit également une forte expression de CD28. Les lymphocytes Th17 sont donc capables de répondre à une stimulation de CD28 en l'absence de signal TCR, ce qui maintient, via une voie indépendante de la PI3 kinase, l'activation de la voie NF-κB et donc la sécrétion d'IL-17 [258,278].

## Régulation de la réponse Th17

Les cellules dendritiques (DC) stimulées par certains agents microbiens vont sécréter de l'IL-12 et de l'IL-23. En fonction de la cytokine dominante, la différenciation se fera vers la voie Th1 ou Th17. Plusieurs PAMPS (*pathogens-associated molecular patterns* : « signaux danger d'origine microbienne») ont été identifiés pour induire la sécrétion d'IL-23 par les DC : les peptidoglycanes, des molécules exprimées par le *candida albicans*, les lectines de type C et le zymosan, via TLR2, NOD2 (*Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*) et les récepteurs des lectines de type C comme Dectin-1 [279,280].

A l'inverse, plusieurs cytokines jouent un rôle négatif dans le développement des lymphocytes Th17. Les cytokines induisant les voies Th1 et Th2, comme l'IFN- $\gamma$  et l'IL-4, régulent négativement la différenciation Th17 [238,255]. L'IL-27 est aussi un puissant inhibiteur des lymphocytes Th17 [281,282]. L'IL-2 inhibe également le développement des lymphocytes Th17. En inhibant l'expression de ROR- $\gamma$ t et en stimulant l'expression de FoxP3 via STAT-5, l'IL-2 induirait le développement de Treg [260] mais ces données restent controversées chez l'Homme [239].

L'acide rétinoïque produit par les DC des muqueuses pourrait inhiber le développement des lymphocytes Th17 au profit des Treg. Ainsi les DC CD103<sup>+</sup> des muqueuses et des organes lymphoïdes de l'intestin qui produisent de l'acide rétinoïque et du TGF- $\beta$  sont de puissantes inductrices de Treg. Il existerait donc à ce niveau un équilibre subtil entre la tolérance vis-à-vis des germes commensaux (rôle des Treg) et les défenses anti-infectieuses vis-à-vis des germes considérés comme pathogènes (rôle des Th17) [283].

Enfin, les lymphocytes Th17 humains sont moins sensibles à l'action suppressive des Treg que les autres populations lymphocytaires [269]. De plus, les lymphocytes Th17 résistent à l'action suppressive du TGF- $\beta$  [266]. Les lymphocytes Th17 ont donc la capacité d'échapper à certains des mécanismes de tolérance périphérique, favorisant ainsi l'émergence et l'entretien de pathologies inflammatoires et auto-immunes.

## **Fonctions effectrices des lymphocytes Th17**

Les lymphocytes Th17 sont caractérisés par leur capacité à sécréter différentes cytokines, essentiellement pro-inflammatoires : l'IL-17A, l'IL-17F et l'IL-22. Ils participent à la réponse anti-infectieuse, notamment vis-à-vis des pathogènes non pris en charge par les lymphocytes Th1 et Th2 et jouent un rôle dans l'émergence ou l'entretien de pathologies dysimmunitaires.

### *Les interleukines-17 A et F*

L'IL-17A (ou IL-17) est le chef de file des 6 cytokines de la famille des IL-17, qui se compose des IL-17 A à F. Elle est sécrétée de façon prédominante par les lymphocytes Th17 mais aussi par les LT  $\gamma\delta$ , les PNN, les PNE, les monocytes et les LT CD8 [284,285]. L'IL-17F est la seconde cytokine de la famille des IL-17 produite par les lymphocytes Th17. Elle présente 50% d'homologie avec l'IL-17A [286]. Elle est également produite par les macrophages [284,285,287]. L'IL-17A et l'IL-17F se lient au récepteur hétérodimérique IL-17RA/IL-17RC. Cependant, l'IL-17A se lie avec plus d'affinité à l'IL-17RA. L'IL-17RA est fortement exprimé par les cellules hématopoïétiques et plus faiblement par les ostéoblastes, les ostéoclastes, les cellules endothéliales et épithéliales. L'IL-17RC est à l'inverse exprimé faiblement par les cellules hématopoïétiques et fortement par les cellules non hématopoïétiques [284,287].

L'IL-17A et l'IL-17F ont des propriétés inflammatoires et agissent sur un grand nombre de cellules. Elles stimulent la granulopoïèse et augmentent le recrutement, l'activation et la migration des PNN et des macrophages. Elles induisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), de G-CSF, de GM-CSF, de chémokines (CXCL1, CXCL6, CXCL8, CXCL10, CINC, CCL2), de prostaglandine E2, de métalloprotéases et ont un rôle synergique avec le TNF- $\alpha$  pour promouvoir l'inflammation [284,285].

L'IL-17 contribue aussi à la formation des centres germinatifs au sein desquels les lymphocytes B (LB) vont subir des mutations somatiques pour améliorer la spécificité des anticorps qui seront ensuite produits [288].

### *L'interleukine-22*

L'IL-22, membre de la famille de l'IL-10 est sécrétée par les lymphocytes Th17 en réponse à une stimulation par l'IL-23, mais aussi par les LT activés et les cellules NK [284]. Le récepteur de l'IL-22 est un hétérodimère composé de l'IL-22R1 et l'IL-10R2. A l'inverse de l'IL-17R, l'IL-22R n'est pas exprimé par les cellules immunitaires mais est exprimé de façon ubiquitaire par les cellules épithéliales et endothéliales. L'IL-22 a un rôle protecteur anti-infectieux au sein des épithéliums [289]. L'IL-22 aurait aussi un rôle dans la pathogénie du psoriasis car elle favorise l'hyperplasie épidermique [284].

### *L'interleukine-21*

L'IL-21 est sécrétée par les lymphocytes Th17, les lymphocytes T folliculaires *helper* et les cellules NK. Le récepteur de l'IL-21 est un hétérodimère composé de la chaîne commune ( $\gamma_c$ ) des récepteurs de classe I et de l'IL-21R. L'IL-21R n'est exprimé que par les cellules hématopoïétiques et est exprimé fortement par les LB, les LT, les cellules NK et certaines cellules myéloïdes. L'IL-21 participe à l'expansion des Th17, favorise la prolifération et la différenciation des LT CD8, la commutation de classe IgG<sub>1</sub> et IgG<sub>3</sub> dans le LB activé, et l'activation de la cytotoxicité des NK [284].

### *Autres cytokines et chémokines*

Les lymphocytes Th17 sont également impliqués dans la réponse inflammatoire via la production de TNF- $\alpha$ . Ils favorisent la résorption osseuse via la sécrétion de RANKL (*Receptor Activator of NF $\kappa$ B Ligand*) [255]. Ils produisent également la chémokine CCL20, ligand de CCR6, permettant leur propre recrutement sur le site de l'inflammation [239].

### **Rôle en physiologie et physiopathologie humaine**

L'implication des lymphocytes Th17 dans les défenses anti-infectieuses, dans les pathologies auto-immunes et inflammatoires chroniques et les traitements

disponibles pour cibler la réponse immunitaire Th17 ont fait l'objet d'une revue qui est présentée en annexe [183].

L'IL-17 joue un rôle primordial dans la réponse anti-infectieuse en initiant et en stimulant la granulopoïèse et en induisant le chimiotactisme des PNN. Le mécanisme par lequel les agents infectieux déclenchent préférentiellement une réponse Th17 est très certainement lié aux propriétés des pathogènes eux-mêmes qui stimulent les cellules de l'immunité innée pour produire des cytokines particulières comme l'IL-23. Cette réponse semble prédominante en cas d'infection fongique puisque les patients qui ont un déficit génétique pour la réponse IL-23/IL-17 ne peuvent pas contrôler ce type d'infection [290]. Ce rôle physiologique des lymphocytes Th17 est également souligné par le fait que les patients présentant un syndrome hyper IgE, lié à un déficit en STAT-3, sont déficitaires en lymphocytes Th17 et présentent des infections bactériennes et fongiques à répétition [258,267,268].

En pathologie humaine, les lymphocytes Th17 sont impliqués dans la physiopathologie de nombreuses maladies auto-immunes ou auto-inflammatoires. Celles pour lesquelles les données sont les plus robustes sont la PR, la SEP, la maladie de Crohn, le psoriasis, le lupus et l'asthme [182,252]. Plus récemment, leur implication dans l'ACG a été mise en évidence [82].

### c) Les lymphocytes Th9

Les lymphocytes Th9 sont d'identification plus récente [291,292] et sont caractérisés par leur capacité à produire de l'IL-9, une cytokine connue jusqu'à présent pour être spécifiquement produite par les lymphocytes Th2 [293]. Lorsque des lymphocytes Th2 murins sont cultivés en présence d'IL-4 et de TGF- $\beta$ , ils perdent la capacité de produire de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 mais continuent à produire de l'IL-9 et de l'IL-10. Ces lymphocytes Th9, malgré la production d'IL-10, n'ont pas de propriétés régulatrices mais jouent au contraire un rôle pro-inflammatoire dans des modèles murins de colite [291,292].

Plus récemment, il a été démontré que l'IL-9 était produite par les lymphocytes Th17 en plus des Th2 et des Th9 [294,295]. De plus, l'IL-9 joue un rôle synergique avec le TGF- $\beta$  dans la différenciation Th17 et sa production est régulée par l'IL-23. A

l'inverse, l'IL-9 renforce l'activité suppressive des Treg CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>. L'IL-9 semble donc avoir un rôle fondamental dans la régulation de la réponse immunitaire [294,295].

d) Les lymphocytes Th22

Initialement, l'IL-22, qui est une cytokine faisant partie de la famille de l'IL-10, avait été décrite comme une cytokine caractéristique des lymphocytes Th17 [296]. Cependant, une nouvelle sous-population de lymphocytes T CD4 mémoires, baptisée lymphocytes Th22, a été identifiée. Ces derniers, essentiellement localisés au niveau cutané, produisent de l'IL-22 mais ni IL-17, ni IFN- $\gamma$ . Leur différenciation requiert la présence d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  ou de cellules dendritiques plasmacytoïdes, est indépendante de RORC et dépend du facteur de transcription AHR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*) [297,298]. Les lymphocytes Th22 expriment CCR6, CCR4 et CCR10, ce qui leur permet de se concentrer au niveau cutané. Ces cellules jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cutanée et dans plusieurs pathologies dysimmunitaires telles que le psoriasis, la PR, la réaction du greffon contre l'hôte et l'allergie [297-299]. Ces cellules n'ont en revanche jamais été étudiées au cours de l'ACG.

e) Les lymphocytes T régulateurs (Treg)

Les Treg constituent une sous-population lymphocytaire aux propriétés immunorégulatrices, dont le rôle dans le maintien de la tolérance périphérique est clairement démontré [300]. FoxP3 (*Forkhead Box Protein 3*) est le facteur de transcription essentiel au développement des Treg [301-303].

Les Treg exprimant FoxP3 (Treg FoxP3<sup>+</sup>) sont capables d'inhiber *in vivo* et *in vitro* l'activation, la prolifération et/ou les fonctions effectrices de nombreuses cellules immunitaires telles que les lymphocytes T CD4 et CD8, les LB, les NK, les NKT, les DC et les macrophages [304,305].

Les Treg FoxP3<sup>+</sup> appartiennent à une plus large famille de cellules T régulatrices capables d'inhiber les réponses effectrices comprenant les lymphocytes

Tr1 producteurs d'IL-10, les Th3 producteurs de TGF- $\beta$ , les LT  $\gamma\delta$  et les LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>. Certains lymphocytes Th2 ou NKT ont également des propriétés régulatrices démontrées par leur capacité à inhiber l'auto-immunité dans certains modèles murins [306-308].

De part leur origine, on distingue deux grands types de Treg FoxP3<sup>+</sup> : les Treg naturels (nTreg) qui sont produits au niveau thymique et les Treg induits (iTreg) qui proviennent de LT naïfs acquérant des propriétés régulatrices sous l'effet de leur activation par certains antigènes et cytokines (IL-2 et TGF- $\beta$  notamment) [309].

### **Caractéristiques phénotypiques des Treg naturels**

#### *Expression membranaire constitutive de CD25.*

Chez l'homme, plusieurs groupes ont démontré que les CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de phénotype mémoire (CD45RO<sup>+</sup>) pouvaient inhiber la prolifération et la production de cytokines de LT via un mécanisme contact dépendant [310-315]. Cependant, et à l'inverse de la souris, les CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ne sont pas tous suppresseurs chez l'homme. Le CD25 correspond en effet à la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'IL-2 et est aussi exprimé par les LT effecteurs après activation. Cependant, les Treg expriment cette molécule de façon constitutive avec une forte intensité et ils ont longtemps été identifiés par le phénotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, bien que la limite retenue en analyse par cytométrie en flux reste sujet à débat [311].

Contrairement aux LT effecteurs, les Treg ne sécrètent pas d'IL-2 après stimulation, le facteur de transcription FoxP3 agissant comme répresseur du gène de cette cytokine [316,317]. C'est la sécrétion paracrine d'IL-2 par les LT effecteurs qui participe à la survie des Treg et à leur activation, comme cela a été observé *in vitro* et *in vivo* chez la souris [318,319].

Cette cytokine est primordiale pour la genèse des Treg, les souris déficientes en IL-2 mourant rapidement de manifestations auto-immunes et d'un syndrome lymphoprolifératif [320]. De même, un défaut de signalisation de la voie de transduction du récepteur de l'IL-2 entraîne la survenue de manifestations auto-immunes associées à un déficit en Treg. Une mutation du récepteur de l'IL-2 a



été identifiée chez l'homme, responsable d'un syndrome lymphoprolifératif, d'une susceptibilité aux infections et de manifestations auto-immunes [321]. De plus, chez la souris, l'utilisation d'un Ac monoclonal anti-IL-2 entraîne une déplétion transitoire des Treg, accompagnée de manifestations auto-immunes [322].

La surexpression de CD25 participe à l'activité immunomodulatrice des Treg en constituant une niche pour l'IL-2, qui n'est alors plus utilisable par les LT effecteurs pour le maintien de leur activation [323]. En effet, la sécrétion autocrine d'IL-2 constitue le 3<sup>ème</sup> signal d'activation des LT et son absence, alors qu'ils subissent une stimulation via leur TCR, entraîne un état d'anergie. Les Treg sont également capables, chez la souris, d'inhiber directement la synthèse d'ARN messager de l'IL-2, le mécanisme impliqué demeurant inconnu [324]. Par ailleurs, la déplétion du milieu en IL-2 inhibe la différenciation et l'activation des LT effecteurs. En effet, l'IL-2 participe à la différenciation des LT naïfs vers les voies Th1 et Th2 et est indispensable à leur activation et à leur survie [325].

### *Expression de FoxP3*

FoxP3 est un facteur de transcription qui agit sous forme oligomérique en se liant à d'autres facteurs de transcription, notamment NFAT, NF-κB, AML1/Runx1 et les complexes HAT/HDAC. Il est capable de réprimer les gènes de l'IL-2 et de CD127 alors qu'il stimule l'expression de GITR et de CTLA-4 [326]. Chez la souris comme chez l'homme, un déficit en FoxP3 entraîne des manifestations auto-immunes associées à un déficit en Treg, ce facteur de transcription étant primordial pour la genèse thymique des Treg [302]. FoxP3 a donc été considéré comme un marqueur spécifique des Treg. Cependant, si cela est vrai chez la souris, chez l'homme, après stimulation via leur TCR, les LT effecteurs sont aussi capables d'exprimer FoxP3, de façon moindre et transitoire, associé [327] ou non à des fonctions régulatrices [328]. L'absence de corrélation entre l'expression de FoxP3 et la présence de propriétés immunorégulatrices ne fait pas de FoxP3 un marqueur totalement spécifique des Treg humains.

### *Autres marqueurs phénotypiques des Treg naturels*

L'expression de **CD127** (chaîne  $\alpha$  du récepteur membranaire à l'IL-7) pourrait permettre une distinction entre Treg et LT activés. En effet, cette molécule est peu exprimée à la surface des Treg, tandis qu'une expression importante est observée à la surface des LT après activation [329]. De plus, son expression est inversement corrélée à celle de FoxP3, ce qui confirme son intérêt dans l'identification et l'isolement des Treg [329,330].

**CD152 (CTLA-4)** est également exprimé de façon constitutive par les Treg, principalement dans le compartiment intracellulaire. Les LT naïfs ne l'expriment à leur surface qu'après activation, de façon retardée et transitoire, ce qui permet la régulation de la réponse immunitaire par interaction avec CD80 et CD86, stoppant le second signal activateur impliquant CD28 et ces molécules de costimulation. CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4*) joue un rôle important dans les phénomènes de tolérance. Après activation des Treg, CD152 est exprimé à la surface et interagit avec les molécules de costimulation CD80 et CD86, exprimées à la membrane des DC [331].

**GITR** (*Glucocorticoid Induced TNF Receptor family Related gene*) est fortement exprimé à la surface des Treg, alors que les LT, LB, DC et macrophages ne l'expriment que faiblement, cette expression étant accrue après activation. Aussi, après activation par un signal danger via les TLR, les DC expriment également le ligand de GITR (GITR-L), qui en liant son récepteur à la surface des Treg, inhibe leurs fonctions régulatrices [332]. Ainsi, GITR pourrait être impliqué dans la régulation de l'activité des Treg, c'est-à-dire la contre-régulation.

**CD39** appartient à la famille des ectonucléoside triphosphate diphosphonucléotidases (E-NTPDases), enzymes capables de métaboliser les nucléosides triphosphates (NTP), dont l'ATP en AMP. L'ATP, outre son rôle dans le métabolisme énergétique, est également un médiateur intercellulaire, notamment au niveau du système nerveux central. Il constitue aussi un signal danger. En effet, la libération massive d'ATP lors de la lyse cellulaire active l'inflammasome et entraîne la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , une cytokine pro-inflammatoire qui est impliquée dans la différenciation Th17. L'ATP joue donc un rôle pro-inflammatoire qui peut être inhibé via sa dégradation par le CD39. Cette molécule est exprimée à la surface des DC,

des LB et LT activés, mais également, et de façon constitutive, à la surface des Treg mémoires humains exprimant CD45RO et CCR6. Chez la souris, pour que cette enzyme soit active, il est nécessaire que les Treg soient stimulés [333]. CD39 est couplé à CD73, une autre ectonucléosidase, capable de cataboliser l'AMP en adénosine, ce dernier inhibant la réponse cellulaire T [334]. CD39 ne constitue donc pas un marqueur spécifique mais reflète un des mécanismes d'action dans le contrôle de la régulation immunitaire par les Treg, par dégradation de l'ATP extracellulaire, pro-inflammatoire, en adénosine, à activité anti-inflammatoire. Compte tenu de la capacité de l'ATP à activer l'inflammasome, les Treg exprimant CD39 sont particulièrement importants dans le contrôle de la réponse Th17 [335].

**CD223** (ou **LAG-3**: *Lymphocyte Activation Gene-3*) est exprimé à la surface des Treg seulement après stimulation. Il s'agit d'une molécule d'adhésion associée au CD4, capable de lier le CMH-II. LAG-3 interviendrait dans les fonctions suppressives dépendantes du contact, bien que les souris invalidées pour le gène LAG-3 ne présentent pas de déficit fonctionnel ou quantitatif en Treg. L'utilisation d'un Ac bloquant LAG-3 entraîne cependant une diminution des fonctions suppressives des Treg et la transfection de LT naïfs avec LAG-3 leur confère un état d'anergie et une fonction suppressive dépendante du contact. Comme de nombreux autres marqueurs, LAG-3 est également exprimé par les LT effecteurs après activation [336].

**CD62-L** est une sélectine impliquée dans la migration (*homing*) des lymphocytes aux ganglions lymphatiques. Les Treg expriment cette molécule membranaire à l'état naïf, et conservent un haut niveau d'expression après activation [337,338]. Ceci traduit donc qu'après contact avec leur Ag, les Treg sont capables de gagner les organes lymphoïdes secondaires où ils peuvent réguler l'initiation de la réponse immunitaire.

Le **TGF- $\beta$**  est une cytokine anti-inflammatoire qui peut également être exprimée à la surface cellulaire. Les Treg expriment TGF- $\beta$  de façon croissante après stimulation. Le TGF- $\beta$  membranaire est impliqué dans les mécanismes d'inhibition de la prolifération et de la sécrétion des Ig par les LB chez la souris [339] et de la prolifération des NK chez l'homme [340-342]. Cependant, les souris dont le gène du TGF- $\beta$  est invalidé, présentent un taux diminué de Treg qui gardent

cependant une activité suppressive. Ceci fait donc envisager un rôle plus important du TGF- $\beta$  dans l'homéostasie des Treg que dans leur activité immunorégulatrice [343].

**ICOS** (*Inductible COStimulator*) est une protéine membranaire non spécifique des Treg, exprimée à la surface des LT après activation. Son ligand, ICOS-L, est exprimé de façon constitutive à la surface des DC et des monocytes, l'expression sur ces derniers étant augmentée par l'IFN- $\gamma$  [344]. ICOS permet de distinguer deux types de Treg [345]. Les Treg ICOS<sup>-</sup> expriment intensément le TGF- $\beta$  à leur surface et leur fonction immunorégulatrice, médiée par cette molécule, est dépendante du contact et s'exerce directement sur les LT effecteurs. Les Treg ICOS<sup>+</sup> expriment aussi le TGF- $\beta$  au niveau membranaire et sécrètent également de grandes quantités d'IL-10 inhibant la maturation des DC *in vitro*. Leur fonction immunosuppressive est complètement abrogée par l'utilisation d'Ac anti-IL-10 et anti-TGF- $\beta$ . Leur action n'est pas directement dirigée contre les LT effecteurs mais passe par une régulation des fonctions des DC. Ces deux populations ont également un comportement différent lors de la stimulation par un Ac anti-CD28 : les Treg ICOS<sup>-</sup> prolifèrent, tandis que la prolifération des Treg ICOS<sup>+</sup> est inhibée [346].

**CD45** est un marqueur panleucocytaire à activité tyrosine phosphatase, essentiel pour une transduction efficace du signal via les récepteurs T et B [347]. Ses différentes isoformes permettent de caractériser les stades de différenciation et d'activation des lymphocytes et ainsi de distinguer les LT naïfs CD45RA<sup>+</sup> et les LT mémoires CD45RO<sup>+</sup> [347]. Il est bien montré que les LT CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> ne sont pas tous suppresseurs. Chez l'Homme, on distingue d'un point de vue phénotypique trois sous-populations de LT CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, avec des propriétés fonctionnelles différentes [346] :

- Les LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+++</sup>CD45RA<sup>-</sup>FoxP3<sup>high</sup> ou Treg effecteurs (*activated* Treg) qui sont les plus suppresseurs mais incapables de proliférer (anergiques) ;
- Les LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>++</sup>CD45RA<sup>+</sup>FoxP3<sup>low</sup> ou Treg naïfs (*resting* Treg) qui sont capables de proliférer et de se différencier en Treg effecteurs ;

- Les LT  $CD4^+CD25^{++}CD45RA^-FoxP3^{low}$  qui ne sont pas suppresseurs mais capables de produire *in vitro* des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- $\gamma$ , l'IL-2 et l'IL-17.

**Helios**, un facteur de transcription de la famille ICAROS impliqué dans le développement des LT, pourrait être un marqueur permettant de distinguer les nTreg (Helios<sup>+</sup>) des iTreg (Helios<sup>-</sup>), même si la validité de ce marqueur n'est pas certaine *in vivo* [348,349].

En résumé, l'identification phénotypique des Treg est rendue difficile par l'absence de marqueurs spécifiques. Ceci rend l'interprétation des données de la littérature délicate puisque les phénotypes étudiés ne sont pas toujours les mêmes et ont évolué avec la découverte de nouveaux marqueurs. Il est donc probable que certaines discordances concernant les taux de Treg observés au cours d'une même pathologie soient en partie liées à des définitions phénotypiques différentes d'une étude à l'autre.

La meilleure manière de définir les Treg est finalement fonctionnelle. Cependant, leur isolation est délicate du fait de l'impossibilité d'utiliser des marqueurs intracellulaires (comme FoxP3) car cela nécessiteraient une perméabilisation des cellules qui entraînerait leur mort. Néanmoins, puisqu'il existe une corrélation inverse entre l'expression de CD127 et de FoxP3, CD127 peut être utilisé pour isoler les Treg en utilisant le phénotype  $CD4^+CD25^+CD127^-$ . Mais, les Treg peuvent aussi, et probablement de façon encore plus discriminative, être isolés selon leur niveau d'expression de CD25 et de CD45RA, sans utiliser CD127 : les Treg effecteurs ( $CD45RA^-$ ) ont le niveau d'expression de CD25 le plus élevé et les Treg naïfs ( $CD45RA^+$ ) expriment CD25 à un niveau intermédiaire [346].

## Caractéristiques fonctionnelles des Treg naturels

### *Anergie*

Les Treg sont classiquement caractérisés par un état d'anergie, c'est-à-dire qu'une stimulation via leur TCR n'entraîne pas leur prolifération. Cette notion a récemment été mise en doute puisqu'après stimulation, les Treg naïfs (CD45RA<sup>+</sup>FoxP3<sup>low</sup>) sont capables de proliférer et d'acquérir un phénotype de Treg effecteurs (CD45RA<sup>-</sup>FoxP3<sup>high</sup>). A l'inverse, les Treg effecteurs prolifèrent peu : après stimulation, ils exercent leurs fonctions suppressives et meurent [346]. Cependant, comme les Treg effecteurs sont capables d'inhiber la prolifération des Treg naïfs, il est difficile de déterminer avec précision la capacité de prolifération d'un pool cellulaire contenant à la fois des Treg effecteurs et des Treg naïfs. Il est donc possible que l'absence de prolifération des Treg décrite initialement soit le reflet d'une inhibition des Treg naïfs par les Treg effecteurs d'une part, et de la mort de ces derniers d'autre part.

### *Inhibition des autres lignées cellulaires*

A ce jour, les connaissances des mécanismes d'inhibition sont imparfaites. Il semble que les Treg acquièrent leurs pleines fonctions inhibitrices après activation par liaison spécifique de leur TCR à l'Ag. Ils opèrent ensuite de façon non spécifique d'Ag [350]. Cette fonction inhibitrice est dépendante du contact intercellulaire [324]. Les Treg sont impliqués dans l'immunorégulation de plusieurs types cellulaires, en inhibant leur activation, leur prolifération et leurs fonctions [305,351]. Les LB présentent *in vitro* une inhibition de leur prolifération, de la production des Ig et de la commutation de classe des Ig lorsqu'ils sont cultivés avec des Treg [339,352]. Les cellules NK voient leur activité cytotoxique diminuée en présence de Treg [340-342]. Les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> présentent une diminution de leur activation, de leur prolifération, de la sécrétion de cytokines et une inhibition de leurs fonctions au contact de Treg [312,314,342,353]. L'activité des DC est également modulée avec une diminution de leur maturation et de leur capacité à présenter des Ag [354].

Les Treg sont également capables d'induire des DC tolérogènes surexprimant l'Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO), inhibant ainsi de façon indirecte la prolifération

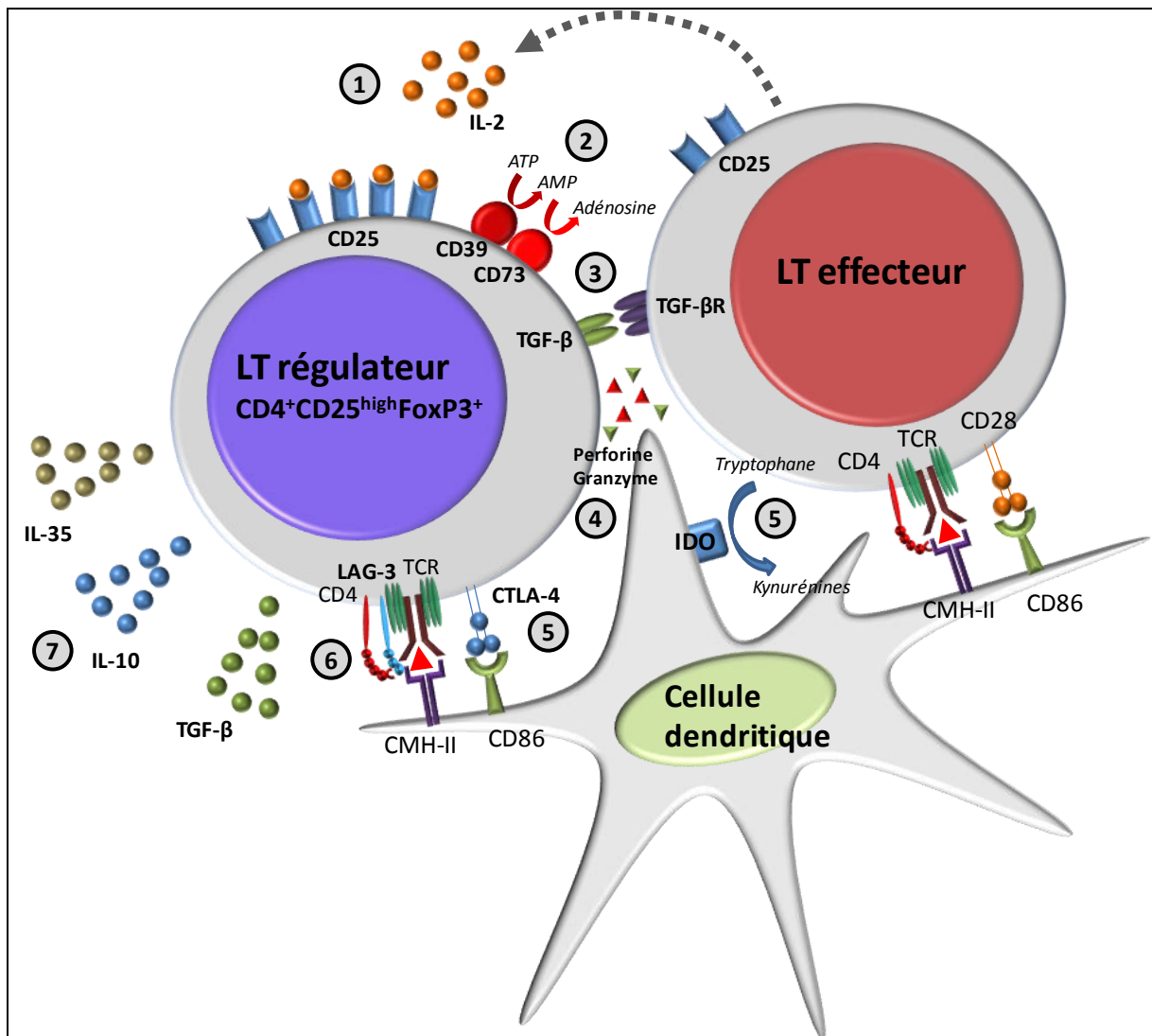
des LT. En effet, IDO catabolise le tryptophane, acide aminé essentiel à la survie et à la prolifération des lymphocytes, en kynurénines. L'induction de cette expression, en l'absence de signaux danger comme le LPS bactérien, est sous la dépendance de l'interaction CTLA-4/CD86. En présence de LPS, c'est l'IL-10 sécrétée par les Treg qui permet la modulation de l'expression de cette enzyme. L'action de cette enzyme est donc double, d'une part par privation d'un acide aminé essentiel, d'autre part par production de métabolites (kynurénines) exerçant une action inhibitrice sur les lymphocytes [355].

Les Treg exercent également une action sur les cellules de l'immunité innée que sont les PNN. Après activation via les TLR, présents à leur surface, les Treg sont capables d'inhiber les PNN. Ceci se traduit par une diminution de la production de radicaux oxygénés, une diminution de la sécrétion de cytokines (IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$ ) et une augmentation de l'apoptose des PNN [356].

#### *Mécanisme d'inhibition*

Chez l'homme, les mécanismes d'inhibition dépendent *in vitro* du contact intercellulaire [314]. Plusieurs molécules membranaires semblent impliquées dans ce mécanisme, notamment CTLA-4, LAG3 et TGF- $\beta$  (Figure 7).

Cependant, d'autres mécanismes, comme les systèmes perforine/granzyme ou CD39/CD73, ne nécessitent pas un contact cellulaire *stricto sensu*, mais une forte proximité [357]. La production de cytokines anti-inflammatoires serait quant à elle plutôt impliquée dans les mécanismes d'immunorégulation des Treg induits en périphérie (Th3 et Tr1), et pas pour les nTreg, d'origine thymique. L'IL-35, une cytokine anti-inflammatoire participe à l'activité immunosuppressive des Treg. Le mécanisme d'action, identifié chez la souris, est original puisque l'induction de la sécrétion d'IL-35 par les Treg nécessite un contact avec les LT effecteurs. L'action de cette cytokine peut ensuite s'exercer à distance, de façon non dépendante du contact. Ainsi, ce ne serait pas l'inhibition qui serait dépendante du contact mais son initiation seulement [358]. L'implication de cette cytokine n'est cependant pas évidente chez l'homme puisque les Treg humains ne semblent pas l'exprimer [359].



**Figure 7 : Mécanismes d'action des Treg**

**1)** Expression de CD25 entraînant une déplétion du milieu extracellulaire en IL-2, cytokine nécessaire à l'activation et à la prolifération lymphocytaire T. **2)** Dégradation par le système enzymatique CD39/CD73 de l'ATP en AMP puis adénosine, toxique pour les LT effecteurs. **3)** Inhibition de l'activation et la prolifération des LT effecteurs via le TGF-β membranaire. **4)** Mort cellulaire via le système perforine/granzyme. **5)** Liaison de CTLA-4 à CD86 (à la place de CD28) entraînant l'expression de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), enzyme dégradant le tryptophane, acide aminé essentiel à la prolifération des LT, en kynurénines, toxiques pour les LT. **6)** Inhibition via l'interaction entre LAG-3 et CMH-II. **7)** Sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF-β, et IL-35 chez la souris).



## Rôle des Treg au cours des pathologies auto-immunes

Des manifestations auto-immunes identiques à celles observées après réalisation d'une thymectomie à 3 jours de vie ont été observées chez la souris dite «*scurfy*». Cette souris, naturellement déficiente en FoxP3, ne possède pas de Treg et développe dans les premiers jours de vie des signes d'auto-immunité comprenant une thyroïdite, une gastrite, un diabète, entraînant rapidement le décès [360]. Chez l'homme, on décrit le syndrome IPEX (*Immune dysfunction Polyendocrinopathy Enterocolopathy X-linked syndrome*), qui se traduit par la survenue dès le plus jeune âge de troubles du transit en rapport avec une entéocolite, d'un diabète, d'une dysthyroïdie, d'un eczéma, associés à un retard de croissance. De multiples mutations de FoxP3 ont été rapportées au cours de ce syndrome [361]. Un syndrome « IPEX-like » est également observé au cours de mutations de CD25 [321].

Au cours des maladies auto-immunes, les Treg ont beaucoup été étudiés, avec des résultats parfois contradictoires. Un déficit quantitatif ou fonctionnel est observé au cours de la PR, du lupus érythémateux systémique, du syndrome de Sjögren, des vascularites cryoglobulinémiques, des vascularites associées aux ANCA, du diabète de type I, de la SEP [309]. Au cours de la PR, il existe des taux plus importants de Treg dans le liquide synovial que dans le sang. Ainsi, un taux de Treg abaissé dans le sang peut témoigner non pas d'un déficit quantitatif mais d'un recrutement des Treg sur le site de l'inflammation. Par ailleurs, le pronostic de la PR est meilleur chez les patients ayant un nombre plus élevé de Treg dans le liquide synovial des articulations atteintes [362].

Aucune donnée n'est actuellement disponible concernant l'existence d'un déficit quantitatif et/ou fonctionnel en Treg au cours de l'ACG.

f) Le concept de plasticité

Il est désormais reconnu que la polarisation Th1, Th2, Th17, Th9, Th22, ou même Treg (iTreg) n'est pas un processus définitif puisqu'en fonction de l'environnement cytokinique local, les LT peuvent évoluer, notamment de Th17 à Th1, de Treg à Th17, ou de Th2 à Th9. En fait, à un état précoce de différenciation, les LT (Th1, Th2, Th17 ou Treg) peuvent être facilement redirigés vers un autre sous-type [203,229,363,364].

En revanche, à un stade plus tardif de différenciation, seuls les lymphocytes Th17 et les Treg semblent conserver une plasticité, les lymphocytes Th1 et Th2 étant différenciés de façon terminale [229]. Les Treg peuvent également, dans un environnement riche en IL-12, se différencier en cellules pro-inflammatoires dépourvues d'activité suppressive, exprimant T-bet et CXCR3 et produisant de l'IFN- $\gamma$ , donc correspondant à un phénotype Th1 [364]. En présence d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6, les Treg peuvent acquérir un phénotype Th17 « like » : ces cellules produisent de l'IL-17, expriment RORC, CD161 et CCR6 mais peuvent conserver une activité suppressive et exprimer FoxP3 (Th17/Treg), sauf en cas de forte exposition à l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6, auquel cas ils perdent leur activité suppressive [364]. De plus, et comme nous l'avons évoqué précédemment, les lymphocytes Th17 peuvent, en présence d'IL-12, se différencier en lymphocytes Th1 en augmentant l'expression de T-bet et en diminuant celle de RORC [269]. Ces lymphocytes Th1, différenciés à partir de Th17, sont dits lymphocytes Th1 « non classiques » car, à l'inverse des lymphocytes Th1 classiques, ils expriment encore des marqueurs de la lignée Th17 comme CD161, CCR6, IL-23R et RORC [258,272,273].

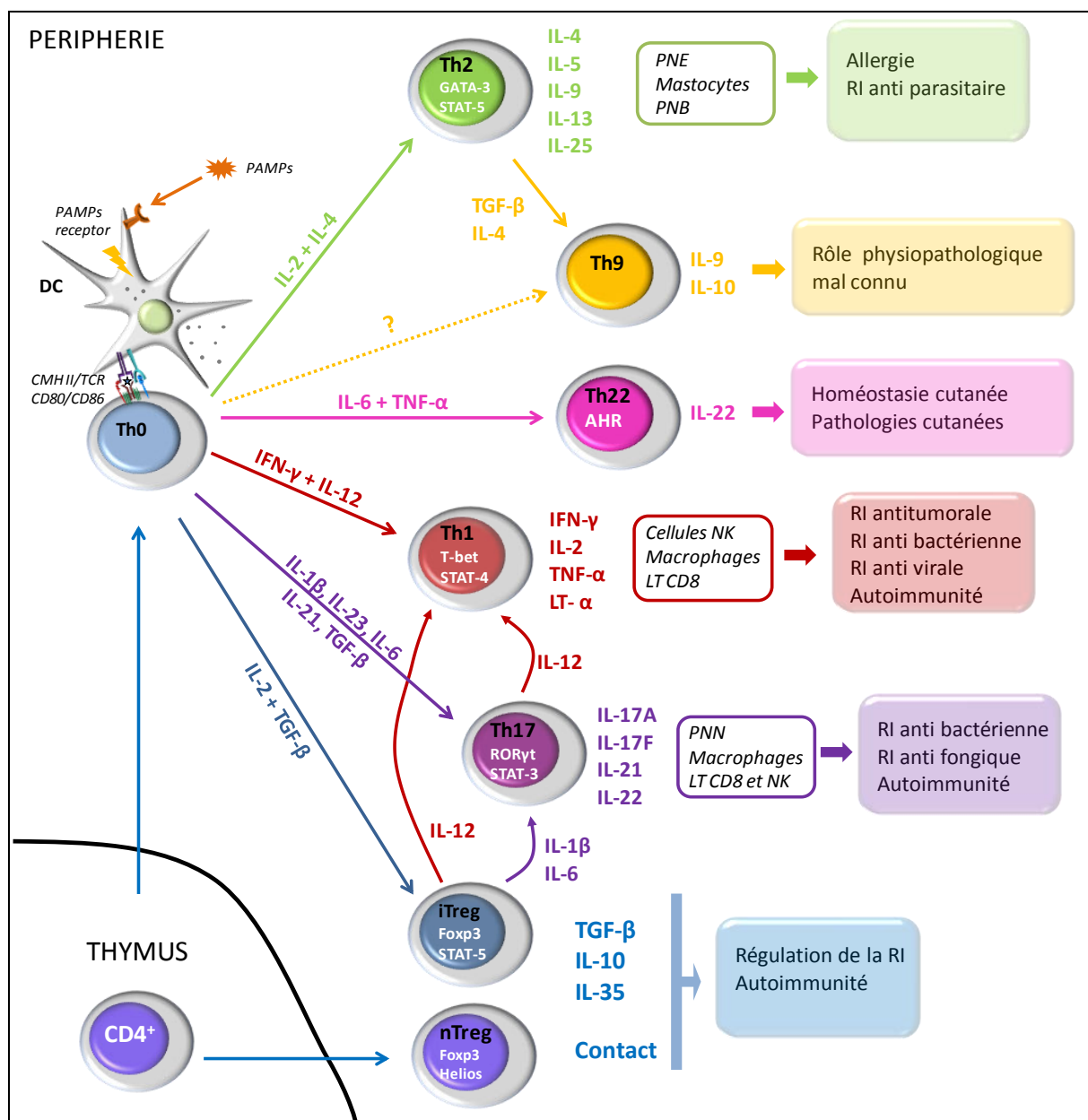
Ainsi, le microenvironnement cytokinique local, conséquence de la réaction immunitaire innée et aussi adaptative, est donc capital dans l'orientation initiale de la réponse immunitaire mais aussi dans son évolution dans le temps. Il est donc fort probable qu'il existe au cours des pathologies auto-immunes et auto-inflammatoires des perturbations de ce microenvironnement, responsables de la chronicisation inadaptée d'une réponse immunitaire autoréactive.

Ces données permettent une approche « dynamique » et non pas « figée » de la réponse immunitaire. Elles mettent en avant le rôle primordial du microenvironnement cytokinique ainsi que les possibilités de réorientation de la réponse immunitaire qui en découlent, notamment par l'utilisation de thérapies

ciblées. Ainsi, un LT pourra subir des polarisations différentes au cours de sa vie, selon les proportions relatives des différents facteurs de transcription à un instant donné, eux-mêmes régulés par de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques [365]. Cette notion de plasticité est probablement impliquée dans la variabilité des réponses thérapeutiques observées d'un patient à l'autre, influencées par le stade de différenciation des LT.

Au cours de l'ACG, C. Weyand propose qu'il existe deux réponses immunitaires T distinctes. Une voie Th17, sous la dépendance de l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-23 produites par les DC, conduisant à l'activation des cellules endothéliales, des CML et des fibroblastes par l'IL-17. Cette voie Th17 est inhibée par la corticothérapie à l'inverse de la voie Th1 qui, sous la dépendance de l'IL-12 produite par d'autres DC, persiste malgré la corticothérapie et conduit à la production chronique d'IFN- $\gamma$  qui active les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules cytotoxiques [82,163]. Cependant, cette hypothèse ne prend pas en compte la plasticité qu'il existe entre les lymphocytes Th1 et Th17. Il est en effet possible que la persistance de lymphocytes Th1 dans le sang circulant et la paroi artérielle de patients atteints d'ACG traités par corticoïdes [82,163] corresponde à l'évolution de la maladie sous traitement, avec une différenciation progressive des Th17 en Th1 « non classiques », plutôt qu'à l'existence de deux voies distinctes.

C'est notamment afin d'explorer la plasticité entre lymphocytes Th1 et Th17, que nous avons étudié le rôle des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> dans l'ACG. Nous nous sommes également intéressés à la plasticité entre les Treg et les lymphocytes Th17, et notamment au rôle de l'IL-6 dans la régulation de cette balance Th17/Treg. Les résultats de ces travaux seront présentés dans la 2<sup>ème</sup> partie de cette thèse.



**Figure 8 : La différenciation des lymphocytes T auxiliaires (Th)** (légende page suivante)

Lorsqu'un lymphocyte T (LT) naïf (Th0) est activé par la reconnaissance d'un antigène présenté par une cellule présentatrice d'antigène (CPA), il peut se différencier en plusieurs populations lymphocytaires : Th1, Th2, Th17, Th22, Th9 ou iTreg. L'orientation de cette différenciation est fonction de l'environnement cytokinique. La cellule présentatrice d'antigène, notamment la cellule dendritique (DC), activée par des PAMPs reconnus comme des « signaux danger » par des récepteurs spécifiques, les PRR dont la famille des *Toll Like Receptor* (TLR) est la plus connue, oriente la différenciation du LT et donc de la réponse immunitaire grâce au type de cytokines sécrétées : Th1 par l'IFN- $\gamma$  et l'IL-12, Th2 par l'IL-4 et l'IL-2, Th17 par le TGF- $\beta$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-23 et l'IL-6, Th22 par le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 ou Treg par le TGF- $\beta$  et l'IL-2. Ces différentes populations de LT coordonnent divers types de réponses immunitaires, notamment via les cytokines qu'ils vont sécréter et qui vont permettre d'activer directement ou indirectement les cellules de la réponse innée. Schématiquement, les lymphocytes Th2 vont participer, avec les mastocytes et les polynucléaires éosinophiles (PNE) et basophiles (PNB) à la réponse immunitaire antiparasitaire et aux mécanismes immunologiques impliqués dans l'allergie, notamment celle médiée par les IgE. En présence de TGF- $\beta$  et d'IL-4, les Th2 se différencient en Th9 dont les caractéristiques et le rôle physio(patho)logique sont encore mal connus. Les lymphocytes Th1 orientent vers la réponse immunitaire à médiation cellulaire en activant les cellules cytotoxiques (cellules NK et LT CD8<sup>+</sup>) et les macrophages qui sont essentiels à la réponse immunitaire antibactérienne et antitumorale. Les lymphocytes Th17 interviennent dans la réponse immunitaire antibactérienne et sont impliqués dans les phénomènes d'auto-immunité. Via l'IL-17, ils stimulent les polynucléaires neutrophiles (PNN) et via l'IL-21 les cellules NK et les LT CD8<sup>+</sup>. Ils ont donc un rôle fortement proinflammatoire, à l'inverse des lymphocytes T régulateurs (Treg) qui ont un rôle suppresseur, garant de l'homéostasie de la réponse immunitaire et dont on distingue 2 grands types en fonction de leur origine : les Treg naturels (nTreg), directement issus du thymus et les Treg induits (iTreg) qui se différencient en présence d'IL-2 et de TGF- $\beta$ . Cette différenciation des lymphocytes T auxiliaires n'est pas un processus figé puisqu'en fonction des cytokines présentes dans leur microenvironnement, les iTreg peuvent se différencier en Th1 ou Th17 et un lymphocyte Th17 peut se différencier en Th1, dit « non classique ». Ce phénomène, appelé plasticité, illustre bien que la réponse immunitaire T est un processus dynamique et non figé dans le temps. Ainsi, le microenvironnement cytokinique local, conséquence de la réaction immunitaire innée et aussi adaptative, est donc capital dans l'orientation initiale de la réponse immunitaire mais aussi dans son évolution dans le temps.

**AHR**: *Aryl Hydrocarbon Receptor* ; **CMH-II** : complexe majeur d'histocompatibilité de type II ; **DC**: cellule dendritique ; **FoxP3** : *Forkhead/winged-helix box protein 3* ; **IL** : interleukine ; **IFN- $\gamma$**  : *interferon-gamma* ; **Th** : (lymphocyte) T *helper* (auxiliaire) ; **NK** : cellule *Natural Killer* ; **PAMPs** : *Pathogen associated molecular patterns*; **PNB** : polynucléaires basophiles ; **PNE** : polynucléaires éosinophiles ; **PNN** : polynucléaires neutrophiles ; **PRR** : *pattern recognition receptor* ; **RI** : réponse immunitaire ; **ROR- $\gamma$ t** : *Retinoic acid-related orphan receptor- $\gamma$ t* ; **STAT** : *Signal Transducer and Activator of Transcription* ; **TCR** : T cell receptor ; **TGF- $\beta$**  : *transforming growth factor- $\beta$*  ; **TNF- $\alpha$**  : *tumor necrosis factor-alpha*.

## **2. Article 1: “Th1 and Th17 lymphocytes expressing CD161 are implicated in Giant Cell Arteritis and Polymyalgia Rheumatica Pathogenesis”**

L'objectif de cette étude était d'analyser la réponse immunitaire lymphocytaire T CD4 au cours de l'ACG et la PPR, notamment les réponses Th1, Th17 et Treg.

Il s'agissait d'une étude prospective au cours de laquelle des prélèvements sanguins ont été obtenus chez 34 patients atteints d'ACG (n=22) ou de PPR (n=12) avant tout traitement, puis chez 27 d'entre eux dont la maladie était en rémission après 3 mois de corticothérapie, et chez 31 sujets sains appariés pour l'âge et indemnes de pathologie infectieuse aiguë ou chronique, auto-immune, cancéreuse, ne recevant aucun traitement anti-inflammatoire, aucune corticothérapie ou traitement cytotoxique ou immunosuppresseur et dont la CRP était inférieure à 5 mg/L.

Dans la première partie de ce travail, nous avons analysé les pourcentages de lymphocytes Th1 ( $CD4^+IFN-\gamma^+IL-17^-$ ), Th17 ( $CD4^+IFN-\gamma^-IL-17^+$ ) et Treg ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ ) circulants et avons montré que les lymphocytes Th17 étaient augmentés au cours de l'ACG et la PPR par rapport à une population témoin appariée pour le sexe et l'âge. La corticothérapie, traitement de référence de l'ACG, permettait de diminuer significativement le pourcentage de lymphocytes Th17 circulants à un niveau équivalent à celui de la population témoin.

Dans cette étude, nous avons également analysé les Treg. Nous avons montré qu'il existait au cours de l'ACG et de la PPR un déficit quantitatif en Treg puisqu'en comparaison aux sujets sains, le pourcentage de Treg circulants était diminué chez les patients non traités. A l'inverse de ce qui était observé pour les lymphocytes Th17, la corticothérapie ne permettait pas de restaurer un pourcentage de Treg circulants équivalent à celui des témoins. Après isolation des Treg ( $CD4^+CD25^{high}$ ), nous avons démontré que leur capacité à inhiber la prolifération des LT effecteurs ( $CD4^+CD25^-$ ) n'était pas altérée au cours de l'ACG et la PPR. Il semble donc exister un déficit quantitatif et non fonctionnel des Treg au cours de l'ACG et la PPR.

Afin d'expliquer l'augmentation de la réponse Th17 au cours de l'ACG et de la PPR, nous avons également étudié les caractéristiques quantitatives et fonctionnelles des LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>. Alors qu'il n'existait aucune différence concernant leur pourcentage dans le sang circulant, les LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> des patients non traités produisaient significativement plus d'IL-17 que ceux des sujets sains. Après corticothérapie, la production d'IL-17 était significativement diminuée, devenant identique à celle de la population témoin. De plus, les LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> étaient capables de produire de l'IFN-γ, correspondant donc à une polarisation Th1 « non classique », sans différence entre patients au diagnostic et sujets sains mais avec une production d'IFN-γ par les LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> significativement diminuée après 3 mois de corticothérapie.

L'étude de l'infiltrat lymphocytaire observé dans les BAT de patients atteints d'ACG nous a permis de mettre en évidence une infiltration massive par des LT (CD3<sup>+</sup>) Th1 (IFN-γ<sup>+</sup>) et Th17 (IL-17<sup>+</sup>). Il existait une co-localisation du marquage IFN-γ et IL-17, compatible avec la présence de lymphocytes Th1/Th17. De manière intéressante, et alors que les LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> ne représentaient que 10% des LT CD4 totaux dans le sang circulant, l'immense majorité des LT infiltrant la paroi artérielle des BAT de sujets atteints d'ACG exprimait aussi CD161. Ainsi, les lymphocytes Th1 observés dans les lésions d'ACG sont probablement de phénotype « non classique » (CD161<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup>).

Les LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> expriment fortement CCR6. Ils sont donc recrutés via une interaction CCL20/CCR6 dans la paroi artérielle. De plus, il a été démontré que les LT CCR6<sup>+</sup> sont nécessaires à l'apparition d'une panartérite ayant les caractéristiques de l'ACG [158]. Ces données apportent donc des précisions à l'hypothèse de C. Weyand [163] puisque l'expression de CD161 par la majorité des LT CD4 (Th1 et/ou Th17) présents dans la paroi artérielle est en faveur d'une différenciation *in situ* des LT vers la voie Th17 puis Th1 non classique, sous l'effet des cytokines du microenvironnement. Il ne semble donc pas réellement exister 2 voies complètement distinctes de réponse immunitaire T au cours de l'ACG : Th1 corticorésistante d'un côté et Th17 corticosensible de l'autre [163].

En conclusion, cette étude montre qu'il existe au cours de l'ACG et de la PPR un déséquilibre de la balance Th17/Treg, caractérisé par un déficit quantitatif en Treg et un excès de Th17. De plus, les LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>, en étant recrutés dans la paroi artérielle et en se différenciant en lymphocytes Th17 et Th1, sont impliqués dans la physiopathologie de l'ACG.



## Th1 and Th17 Lymphocytes Expressing CD161 Are Implicated in Giant Cell Arteritis and Polymyalgia Rheumatica Pathogenesis

Maxime Samson,<sup>1</sup> Sylvain Audia,<sup>1</sup> Jennifer Fraszczak,<sup>2</sup> Malika Trad,<sup>2</sup> Paul Ornetti,<sup>3</sup> Daniela Lakomy,<sup>3</sup> Marion Ciudad,<sup>2</sup> Vanessa Leguy,<sup>3</sup> Sabine Berthier,<sup>3</sup> Julien Vinit,<sup>3</sup> Patrick Manckoundia,<sup>3</sup> Jean-Francis Maillefert,<sup>3</sup> Jean-François Besancenot,<sup>3</sup> Serge Aho-Glele,<sup>3</sup> Nils Olivier Olsson,<sup>3</sup> Bernard Lorcerie,<sup>3</sup> Loïc Guillevin,<sup>4</sup> Luc Mouthon,<sup>4</sup> Philippe Saas,<sup>5</sup> Andrew Bateman,<sup>6</sup> Laurent Martin,<sup>3</sup> Nona Janikashvili,<sup>2</sup> Nicolas Larmonier,<sup>7</sup> and Bernard Bonnotte<sup>1</sup>

**Objective.** Giant cell arteritis (GCA) is the most frequently occurring vasculitis in elderly individuals, and its pathogenesis is not fully understood. The objective of this study was to decipher the role of the major CD4+ T cell subsets in GCA and its rheumatologic form, polymyalgia rheumatica (PMR).

**Methods.** A prospective study of the phenotype and the function of major CD4+ T cell subsets (Th1, Th17, and Treg cells) was performed in 34 untreated patients with GCA or PMR, in comparison with 31 healthy control subjects and with the 27 treated patients who remained after the 7 others withdrew.

**Results.** Compared with control subjects, patients with GCA and patients with PMR had a decreased frequency of Treg cells and Th1 cells, whereas the percentage of Th17 cells was significantly increased. Furthermore, an analysis of temporal artery biopsy specimens obtained from patients affected by GCA for whom biopsy results were positive demonstrated massive infiltration by Th17 and Th1 lymphocytes without any Treg cells. After glucocorticoid treatment, the percentages of circulating Th1 and Th17 cells decreased, whereas no change in the Treg cell frequency was observed. The frequency of CD161+CD4+ T cells, which are considered to be Th17 cell precursors, was similar in patients and control subjects. However, these cells highly infiltrated GCA temporal artery biopsy specimens, and their ability to produce interleukin-17 in vitro was significantly enhanced in patients with GCA and patients with PMR and was correlated with a decrease in the phosphorylated form of STAT-1.

**Conclusion.** This study is the first to demonstrate that the frequency of Treg cells is decreased in patients with GCA and patients with PMR, and that CD161+CD4+ T lymphocytes, differentiated into Th1 cells and Th17 cells, are involved in the pathogenesis of GCA and PMR.

Giant cell arteritis (GCA) is a systemic vasculitis affecting large and medium-sized blood vessels. GCA is characterized by granulomatous infiltration into the layers of the aorta and its major branches in association with systemic inflammation, leading to anemia, polymyalgias, and weakness. Classic clinical features of GCA include temporal headache, scalp tenderness, or tender

AFSSAPS no.: 2009-A00534-53.

Supported by grants from the University Hospital of Dijon, the Direction de la Recherche Clinique, and the Conseil Régional de Bourgogne 2010 (to Drs. Audia and Bonnotte).

<sup>1</sup>Maxime Samson, MS, Sylvain Audia, MD, PhD, Bernard Bonnotte, MD, PhD: Université de Bourgogne and CHU Dijon le Bocage, Dijon, France, and INSERM, UMR 1098, Besançon, France; <sup>2</sup>Jennifer Fraszczak, PhD, Malika Trad, MS, Marion Ciudad, BS, Nona Janikashvili, PhD: Université de Bourgogne, Dijon, France, and INSERM, UMR 1098, Besançon, France; <sup>3</sup>Paul Ornetti, MD, PhD, Daniela Lakomy, MD, PhD, Vanessa Leguy, MD, Sabine Berthier, MD, Julien Vinit, MD, Patrick Manckoundia, MD, PhD, Jean-Francis Maillefert, MD, PhD, Jean-François Besancenot, MD, Serge Aho-Glele, MD, PhD, Nils Olivier Olsson, MD, Bernard Lorcerie, MD, Laurent Martin, MD, PhD: CHU, Dijon, France; <sup>4</sup>Loïc Guillevin, MD, Luc Mouthon, MD, PhD: Université Paris Descartes and Hôpital Cochin, AP-HP, Paris, France; <sup>5</sup>Philippe Saas, MD, PhD: INSERM, UMR 1098, Besançon, France; <sup>6</sup>Andrew Bateman, MD, PhD: Southampton General Hospital, Southampton, UK; <sup>7</sup>Nicolas Larmonier, PhD: Steele Children's Research Center, University of Arizona, Tucson.

Address correspondence to Bernard Bonnotte, MD, PhD, Université de Bourgogne, INSERM, UMR 1098, CHU Dijon le Bocage, Bâtiment B2, 2 Boulevard Mal de Latre de Tassigny, 21000 Dijon, France. E-mail: bernard.bonnotte@u-bourgogne.fr.

Submitted for publication December 9, 2011; accepted in revised form July 19, 2012.

inflammatory temporal arteries in association with decreased pulses on physical examination. Major complications include blindness, stroke, or aortic aneurysm. The diagnosis of GCA is established by temporal artery biopsy, which typically shows destruction of the internal elastic lamina associated with infiltration of the blood vessel walls by multinucleated giant cells and immune cells such as CD4+ T lymphocytes and macrophages organized in granulomas. Polymyalgia rheumatica (PMR) is the rheumatologic form of GCA and is associated with stiffness and tenderness of the hip and shoulder as well as systemic inflammation (1).

Glucocorticoids remain the gold standard of therapy for GCA and PMR. Adjunctive treatment with methotrexate has been shown to lower the risk of relapse and reduce the required exposure to corticosteroids (2). Other attempts to spare glucocorticoid treatment by using anti-tumor necrosis factor (anti-TNF) antibodies have not led to significant success (3,4). Therefore, a better understanding of the pathophysiology of this inflammatory disease is essential to develop appropriate therapeutic approaches. Using human temporal artery segments implanted into SCID mice and cell depletion or blocking antibodies, it has been demonstrated that mature dendritic cells (DCs) and CD4+ T lymphocytes play a key role in GCA (5–7). Mature DCs present a yet-to-be-defined antigen to specific CD4+ T cells that promote macrophage and smooth muscle cell activation, leading to destruction of the artery walls and hyperplasia of the intima (5–7).

It was recently reported that Th17 lymphocytes may contribute to the pathogenesis of GCA (8,9). Th17 cells are characterized by their ability to produce interleukin-17 (IL-17), a proinflammatory cytokine triggering a chronic inflammatory immune response involved in autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, and Crohn's disease (10,11). Th1/Th17 cells, which produce both interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) and IL-17, share the following phenotypic and functional features with Th17 cells: expression of IL-23 receptor, CCR6, and the transcription factor ROR $\gamma$ t; low cytotoxicity; and poor susceptibility to regulation by autologous Treg cells (12,13). The Th1/Th17 cell population is present in patients with GCA and patients with Crohn's disease and is lacking in healthy individuals (8,13).

Human chronic inflammatory diseases are characterized by an imbalance between effector T cells such as Th1 or Th17 cells and immunosuppressive cells such as Treg cells. A functional and/or quantitative Treg cell defect is usually observed in the setting of autoimmunity (14). The role of Treg cells, their frequency, and their

possible functional alterations in GCA and PMR have not yet been evaluated. Human Th17 and Th1/Th17 cells have been shown to differentiate exclusively from CD161+CD4+ T lymphocytes in the presence of IL-1 $\beta$  and IL-23 (12,15). However, it is unknown whether these Th17 cell precursors play a role in GCA and PMR.

In the current study, we demonstrate that GCA and PMR share the same pathogenesis, which is characterized by a significant shift in the Th17 cell/Treg cell balance toward an increased Th17 cell response. We also further establish that glucocorticoids decrease the frequency of Th17 lymphocytes without affecting the frequency and function of Treg cells. We additionally provide new insights into the mechanism underlying the observed increase in the frequency of Th17 cells, by demonstrating that CD161+CD4+ T lymphocytes are implicated in the pathogenesis of GCA and PMR.

## PATIENTS AND METHODS

**Patients and control subjects.** In this prospective study, 34 patients with newly diagnosed GCA ( $n = 22$ ) or PMR only ( $n = 12$ ) were successively enrolled at the hospital of Université de Bourgogne after they provided written informed consent, in accordance with the Declaration of Helsinki. The study was approved by the Institutional Review Board and the Ethics Committee of Dijon University Hospital. GCA and PMR were defined according to the criteria described by Evans and Hunder and the American College of Rheumatology criteria, respectively (16,17). Among patients with GCA, the results of temporal artery biopsy were positive in 7; 1 patient refused to undergo the procedure. Details on the clinical and biologic characteristics of the patients with GCA and those with PMR are available upon request from the corresponding author.

Blood samples were obtained from all 34 patients before treatment and from 27 paired patients (18 with GCA and 9 with PMR) after 3 months (mean  $\pm$  SEM 102.6  $\pm$  6.7 days) of glucocorticoid therapy. In all of the patients, clinical and biologic remission was achieved. One of the untreated patients was lost to followup, and 6 others had received treatment for <3 months at the time of analysis. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from 31 healthy age-matched volunteers without an inflammatory syndrome (C-reactive protein [CRP] level <5 mg/liter), recent therapy with steroids or immunosuppressive drugs, a history of cancer, recent acute or chronic infectious disease, or autoimmune disease were used as controls.

As expected, the CRP level, fibrinogen expression, and erythrocyte sedimentation rate (ESR) were increased in patients with GCA or PMR. The numbers of circulating CD4+ T cells were not significantly different between patients and control subjects, whereas the numbers of CD8+ T lymphocytes were significantly decreased in patients with GCA or PMR (additional information is available upon request from the corresponding author). The demographic and biologic characteristics (age, sex, ESR, and hemoglobin, CRP, and fibrinogen levels) and lymphocyte subsets (CD3, CD4, and CD8 T cells)

were not different between patients with GCA and those with PMR (data not shown). Glucocorticoid treatment was started at a dose of 0.7 mg/kg/day in patients with GCA, and patients with PMR were initially treated with 20–40 mg of prednisone daily. The decision to taper glucocorticoid therapy was made by the treating physicians and was based on clinical and biologic findings during followup.

**Cell preparation, culture, and flow cytometric analysis.** PBMCs were obtained by Ficoll-Hypaque density-gradient centrifugation. CD4<sup>+</sup> T cells were separated using a CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) and stimulated with 0.1  $\mu$ g/ml of phorbol myristate acetate (PMA) and 1  $\mu$ g/ml of ionomycin (Sigma-Aldrich) for 8 hours, in the presence of brefeldin A (BD GolgiPlug; BD Bioscience) for the last 4 hours. Cells were stained with allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD4, PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD161, eFluor 450-conjugated anti-CD45RA, phycoerythrin (PE)-conjugated anti-IL-17A, APC-conjugated anti-IFN $\gamma$ , Pacific Blue-conjugated anti-TNF $\alpha$  (eBioscience), and Alexa Fluor 488-conjugated anti-CCR6 (BioLegend). Treg cells were stained with PE-Cy5.5-conjugated anti-CD4, PE-conjugated anti-CD25, and Alexa Fluor 488-conjugated anti-FoxP3 (BioLegend). Data were acquired on a LSR II flow cytometer and analyzed with FlowJo software.

**Isolation and culture of CD161+CD4<sup>+</sup> T cells.** After the negative selection of CD4<sup>+</sup> T cells, CD161+CD4<sup>+</sup> T cells were purified by positive selection using PE-conjugated anti-CD161 antibodies (eBioscience) and anti-PE microbeads (Miltenyi Biotec), according to the manufacturers' instructions. CD161+CD4<sup>+</sup> T cells were cultured with or without anti-CD3/CD28-conjugated T cell expander microbeads (10  $\mu$ l/10<sup>6</sup> cells; Invitrogen), IL-23 (50 ng/ml; eBioscience), IL-1 $\beta$  (50 ng/ml), IL-2 (25 IU/ml), and transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) (0.5 or 5 ng/ml; R&D Systems), as indicated. The supernatant was collected after 72 hours of culture to quantify specific cytokines.

**Analysis of pSTAT-1 and pSTAT-3.** Total proteins were extracted from freshly isolated CD161+CD4<sup>+</sup> T cells, using a nuclear extract kit (Active Motif). The protein concentration was determined in each whole cell extract with a DC Protein Assay Kit II (Bio-Rad), according to the manufacturer's instructions. Next, 10  $\mu$ g of CD161+CD4<sup>+</sup> whole cell extract was used to determine the levels of pSTAT-1 and pSTAT-3, using a TransAM STAT Family Kit (Active Motif) according to the manufacturer's instructions. COS-7 (IFN $\gamma$ -stimulated) and HEp-G2 (IL-6-stimulated) nuclear extracts (Active Motif) were used as positive controls for pSTAT-1 and pSTAT-3, respectively. The concentrations of cellular pSTAT-1 and pSTAT-3 were quantified by color reactions at an optical density of 450 nm.

**Proliferation assays.** CD4+CD25<sup>high</sup> (Treg) cells and CD4+CD25<sup>low</sup> (effector T) cells were isolated from PBMCs using a Treg cell isolation kit (Miltenyi Biotec), according to the manufacturer's instructions. Effector T cells were stained using a CellTrace Violet Cell Proliferation Kit (Invitrogen) and cultured with or without anti-CD2/CD3/CD28 microbeads (Miltenyi Biotec) and Treg cells, as indicated. After 4 days of culture, cell trace incorporation was analyzed by flow cytometry, and the proliferation index was calculated using ModFit LT 3.0 software.

**Cytokine assays.** The expression of IL-21, IL-23, and TGF $\beta$  was measured by enzyme-linked immunosorbent assay,

according to the manufacturer's instructions (eBioscience). TNF $\alpha$ , IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, and IL-12p70 expression was quantified using Luminex technology, according to the manufacturer's instructions (Biomedical Diagnostics). Data were acquired on a FIDIS flow cytometer and analyzed using MLX-Booster software.

**Immunohistochemical analysis.** Seven temporal artery biopsy specimens obtained from patients with GCA were studied by immunohistochemistry. Staining was performed using a BenchMark Ultra instrument (Ventana Medical Systems) with the following antibodies: anti-CD3 (1:50; Thermo Scientific), anti-CD20 (1:200; Dako), anti-FoxP3 (1:100; Abcam), anti-IL-17A (1:100; R&D Systems), anti-IFN $\gamma$  (1:100; LifeSpan Biosciences), anti-CD68 (1:100; Dako), and anti-CD161 (1:20; Sigma Aldrich). Visualization was based on enzymatic conversion of diaminobenzidine (DAB) into a brown-colored precipitate by horseradish peroxidase at the site of antigen localization. Ultra Red (Ventana Medical Systems) and DAB were used successively to perform double staining.

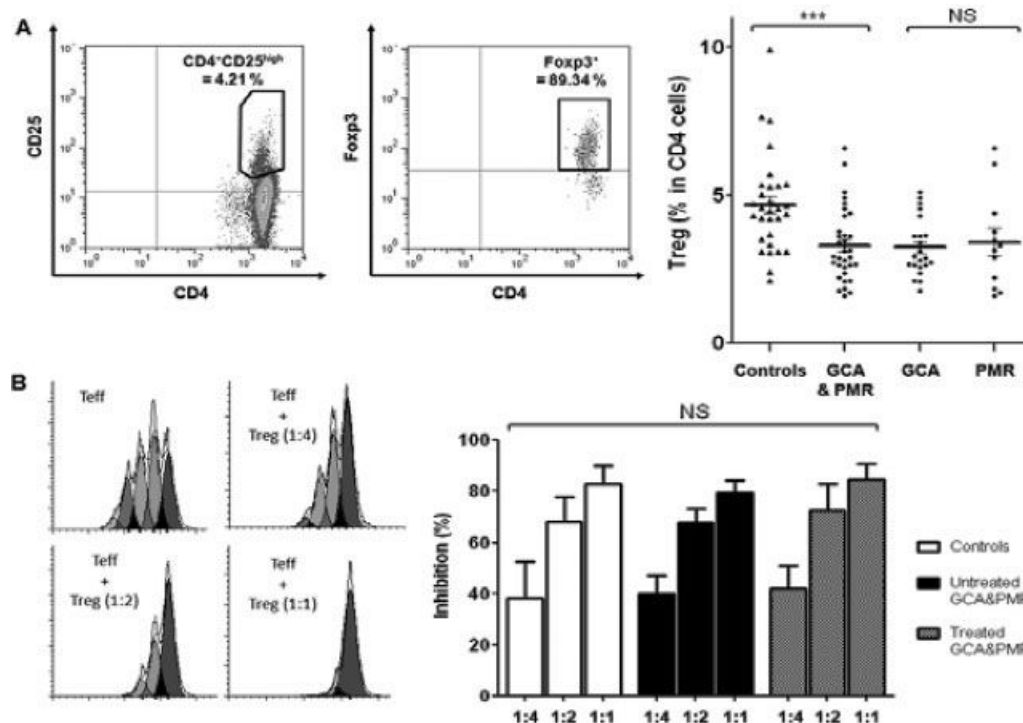
**Statistical analysis.** The Mann-Whitney U test was used to compare data between untreated patients and healthy control subjects. Wilcoxon's matched pairs signed rank test was used to compare patients before and after 3 months of treatment. *P* values less than 0.05 were considered significant. The relationship between the percentage of CD161+CD4<sup>+</sup> cells and IL-17-positive CD4<sup>+</sup> cells was assessed using a linear regression model. An adjustment on the group (untreated patients, treated patients, and controls) was then performed. The linearity of the relationship between the 2 variables was checked using a fractional polynomial approach. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Analyses were performed using Stata and GraphPad Prism software.

## RESULTS

**Frequency of immunosuppressive Treg cells and proinflammatory Th17 lymphocytes in patients with GCA or PMR.** The percentage of circulating Treg cells, identified as CD4+CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells, was significantly reduced in patients with GCA or PMR compared with healthy control subjects (mean 3.29% versus 4.66% of total CD4<sup>+</sup> cells; *P* = 0.0002) (Figure 1A). The Treg cell frequencies in patients with GCA and patients with PMR were not significantly different (Figure 1A). Three phenotypically and functionally distinct populations of CD4+FoxP3<sup>+</sup> T cells (18) were also assessed.

Whereas the numbers of circulating CD4+FoxP3<sup>+</sup> T cells were significantly decreased in patients with GCA or PMR, the distribution of CD4+FoxP3<sup>high</sup>CD45RA<sup>−</sup> activated Treg cells, CD4+FoxP3<sup>low</sup>CD45RA<sup>+</sup> resting Treg cells, and CD4+FoxP3<sup>low</sup>CD45RA<sup>−</sup> effector T cells among total CD4+FoxP3<sup>+</sup> T cells was not different between patients and control subjects (additional information is available upon request from the corresponding author). Importantly, the immunosuppressive function of Treg cells (CD4+CD25<sup>high</sup>) was not significantly different between patients with GCA or PMR and



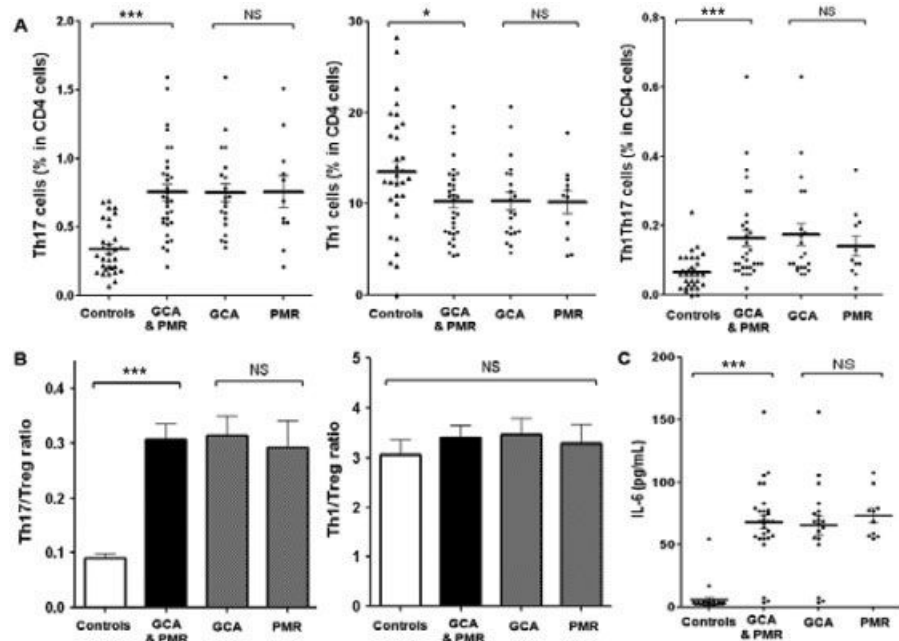


**Figure 1.** Decreased numbers but unaltered suppressive activity of Treg cells in giant cell arteritis (GCA) and polymyalgia rheumatica (PMR). **A**, Flow cytometric analysis of Treg cells, defined by a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> phenotype, in patients (n = 34 [22 with GCA and 12 with PMR]) and control subjects (n = 31). In this example, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells accounted for 4.21% of CD4<sup>+</sup> cells. When gated on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> cells, 89.34% expressed FoxP3, so that Treg cells accounted for 3.76% of total CD4<sup>+</sup> T cells ( $4.21 \times 0.8934$ ). The right panel shows results in individual subjects. Horizontal lines show the mean. **B**, Functional analysis of Treg cells. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> (Treg) cells and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>−</sup> (effector T [Teff]) cells were magnetically isolated from the peripheral blood mononuclear cells of untreated patients with GCA or PMR (n = 10), control subjects (n = 7), and treated patients with GCA or PMR (n = 6). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>−</sup> cells were stained using a CellTrace Violet Cell Proliferation Kit, stimulated with anti-CD2, anti-CD3, and anti-CD28 microbeads, and cultured with or without Treg cells at different Treg cell:Teff cell ratios. The proliferation index for each condition was measured using ModFit LT 3.0 software. The percentage of inhibition was calculated using the proliferation index of stimulated Teff cells without Treg cells as reference. Percentages of inhibition were compared ratio to ratio. Bars show the mean  $\pm$  SEM. \*\*\* =  $P = 0.0002$  by Mann-Whitney U test. NS = not significant.

control subjects. In both groups, Treg cells similarly reduced the proliferation of responder T cells, with a 40% reduction at a ratio of 1:4 and almost total suppression at a ratio of 1:1 (Figure 1B). Conversely, the percentages of circulating IL-17–positive T lymphocyte subsets among total CD4<sup>+</sup> T cells were significantly higher in patients with GCA or PMR compared with healthy control subjects (0.75% versus 0.34% of Th17 cells [CD4<sup>+</sup>IL-17+IFN $\gamma$ −] [ $P < 0.0001$ ] and 0.16% versus 0.07% of Th1/Th17 cells [CD4<sup>+</sup>IL-17+IFN $\gamma$ +] [ $P < 0.0001$ ]) (Figure 2A). In contrast, fewer circulating Th1 cells (CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ +IL-17−) were detected in patients with GCA or PMR compared with control subjects (10.26% versus 13.50% of CD4<sup>+</sup> T cells;  $P = 0.0304$ ) (Figure 2A). The frequencies of Th17, Th1, and Th1/Th17 cells were not different between patients with PMR and patients with GCA (Figure 2A).

To assess the balance between proinflammatory

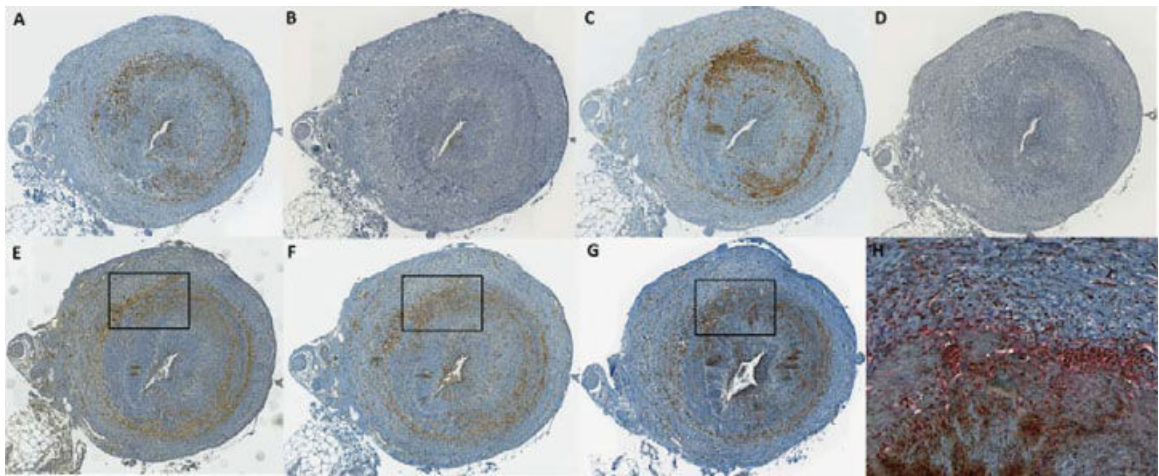
and immunosuppressive T cells in GCA and PMR, the ratios of Th17 cells, Th1/Th17 cells, and Th1 cells to Treg cells (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>) were determined. A substantial difference in the Th17 cell:Treg cell and Th1/Th17 cell:Treg cell ratios was observed between patients with GCA or PMR and control subjects ( $P < 0.0001$ ), whereas the Th1 cell:Treg cell ratio was significantly different between patients and control subjects (Figure 2B and results not shown). In addition, the level of IL-6 was significantly increased in the serum of patients with PMR or GCA compared with control subjects (68.38 pg/ml versus 5.82 pg/ml;  $P < 0.0001$ ) (Figure 2C). The concentration of IL-6 was similar in patients with GCA and patients with PMR (Figure 2C). Conversely, no significant difference in the concentration of IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-12p70, IL-21, IL-23, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , or TGF $\beta$  was detected between patients with GCA or PMR and control subjects (data not shown).



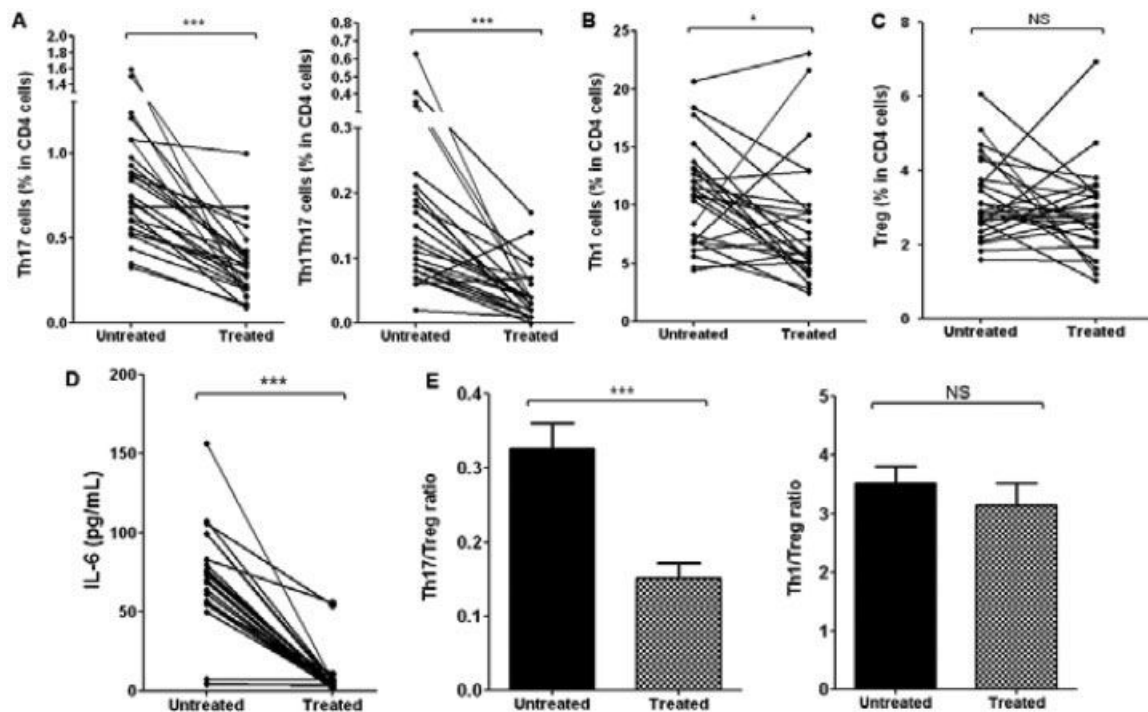
**Figure 2.** Increased numbers of Th17 cells and Th1/Th17 cells and decreased numbers of Th1 cells in patients with GCA or PMR. **A**, Percentages of circulating Th17 cells (interleukin-17 [IL-17] positive, interferon- $\gamma$  [IFN $\gamma$ ] negative), Th1 cells (IL-17-IFN $\gamma$ +), and Th1/Th17 cells (IL-17+IFN $\gamma$ +), as determined by flow cytometry. **B**, Th17 cell:Treg cell and Th1 cell:Treg cell ratios in patients with GCA (n = 19), patients with PMR (n = 10), and healthy control subjects (n = 31). **C**, Expression of IL-6 in the serum of untreated patients with GCA (n = 19) or PMR (n = 10) and control subjects (n = 28). Horizontal lines in **A** and **C** show the mean. Bars in **B** show the mean  $\pm$  SEM. \* =  $P = 0.03$ ; \*\*\* =  $P < 0.0001$ , by Mann-Whitney U test. See Figure 1 for other definitions.

In order to analyze tissue-infiltrating immune cells, 7 temporal artery biopsy specimens from patients with GCA and 4 temporal artery biopsy specimens from patients with PMR were analyzed by immunohistochemistry. As shown in Figure 3, the wall of the arteries in

GCA temporal artery biopsy specimens was infiltrated by macrophages and lymphocytes, which were mainly Th1 (IFN $\gamma$ +) and Th17 (IL-17+) cells. These cells infiltrated all of the layers of the arteries but were preponderant at the junction between the adventitia and



**Figure 3.** Immunohistochemical analysis of temporal artery biopsy specimens from patients with GCA. **A–G**, Temporal artery biopsy specimens representative of those from patients with GCA (n = 7), stained with anti-CD3 (**A**), anti-FoxP3 (**B**), anti-CD68 (**C**), anti-CD20 (**D**), anti-interleukin-17A (**E**), anti-interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) (**F**), and anti-CD161 (**G**). Stained cells appear in brown. Boxed areas show the junction between the adventitia and the media. Original magnification  $\times 40$ . **H**, Higher-magnification view of the boxed areas in **E–G**, showing double staining with IFN $\gamma$  (red) and CD161 (brown). Staining was available for 2 biopsy specimens. See Figure 1 for other definitions.



**Figure 4.** Effect of steroid therapy on cytokines and T cell subsets, as analyzed in 27 patients (18 with giant cell arteritis [GCA] and 9 with polymyalgia rheumatica [PMR]) before and after glucocorticoid therapy. **A–C**, Flow cytometric analysis of the percentage of circulating Th17 cells (IL-17+IFN $\gamma$ -), Th1/Th17 cells (IL-17+IFN $\gamma$ +), Th1 cells (IL-17-IFN $\gamma$ +), and Treg cells (CD4+CD25<sup>high</sup>Foxp3+). **D**, IL-6 expression in the serum of patients with GCA or PMR before and after glucocorticoid therapy, as determined using Luminex technology. **E**, Th17 cell:Treg cell ratio and Th1 cell:Treg cell ratio. Bars show the mean  $\pm$  SEM. \* =  $P = 0.02$ ; \*\*\* =  $P < 0.001$ , by Wilcoxon's signed rank test. NS = not significant (see Figure 2 for other definitions).

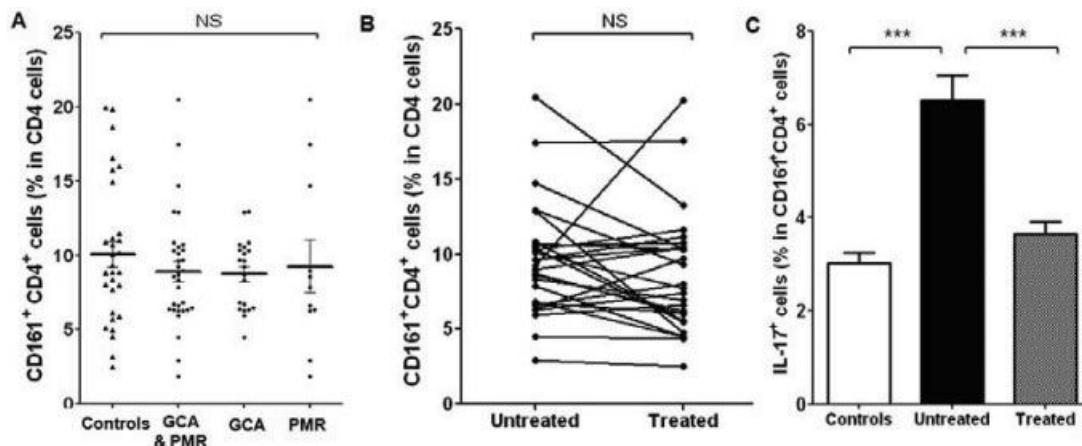
the media. Conversely, very few Treg cells (FoxP3+) were detected. Almost no B lymphocytes were present in the analyzed tissue specimens (Figure 3). In PMR biopsy specimens, neither T cells (CD3+), B cells (CD20+), nor macrophages (CD68+) were identified (results not shown).

**Effect of glucocorticoid therapy on IL-17-producing cells and Treg cells.** To analyze the effect of glucocorticoids on Th1, Th17, and Treg lymphocytes in patients with GCA or PMR, blood samples were collected from 27 patients after 3 months of treatment. All patients achieved clinical remission associated with a significant decrease in the CRP level, the ESR, and fibrinogen expression. A significant increase in the frequency of leukocytes after glucocorticoid therapy was detected and was associated with an increase in the neutrophil count. The total lymphocyte numbers remained unchanged across groups (additional information is available upon request from the corresponding author).

After 3 months of glucocorticoid therapy, patients with GCA and patients with PMR exhibited a

significant decrease in the mean percentage of total circulating IL-17-producing CD4+ T cells (from 0.81% to 0.35% [ $P < 0.0001$ ] of Th17 cells and from 0.17% to 0.04% [ $P < 0.0001$ ] of Th1/Th17 cells) (Figure 4A). Glucocorticoid therapy also triggered a significant decrease in the mean percentage of circulating Th1 cells (from 10.74% to 8.24% [ $P = 0.017$ ]) (Figure 4B). The percentage of Treg cells, although slightly reduced, was not significantly different before and after glucocorticoid therapy (Figure 4C). Importantly, glucocorticoids did not impair the immunosuppressive function of Treg cells, because purified CD4+CD25<sup>high</sup> cells from treated patients were endowed with the same ability to inhibit the proliferation of stimulated effector T cells as CD4+CD25<sup>high</sup> cells isolated from untreated patients (Figure 1B). These steroid-induced modifications were associated with a significant decrease in the peripheral concentration of IL-6 (Figure 4D). The Th1 cell:Treg cell ratio was not modified after treatment, whereas the Th17 cell:Treg cell ratio was significantly reduced by glucocorticoids (Figure 4E), indicating that although these drugs did not modify Treg cell frequency, they





**Figure 5.** Cytometric analysis of circulating CD161+CD4+ T cells. **A**, Percentage of circulating CD161+CD4+ T cells in untreated patients with GCA ( $n = 21$ ) or PMR ( $n = 11$ ) compared with healthy control subjects ( $n = 31$ ). **B**, Percentage of circulating CD161+CD4+ T cells before and after glucocorticoid treatment ( $n = 27$  untreated patients and 27 treated patients). **C**, Percentage of interleukin-17 (IL-17)-positive cells in total CD161+CD4+ T cells from control subjects ( $n = 31$ ), untreated patients ( $n = 32$ ), and treated patients ( $n = 26$ ). Horizontal lines in **A** show the mean. Bars in **C** show the mean  $\pm$  SEM. \*\*\* =  $P < 0.001$  by Mann-Whitney U test. See Figure 1 for other definitions.

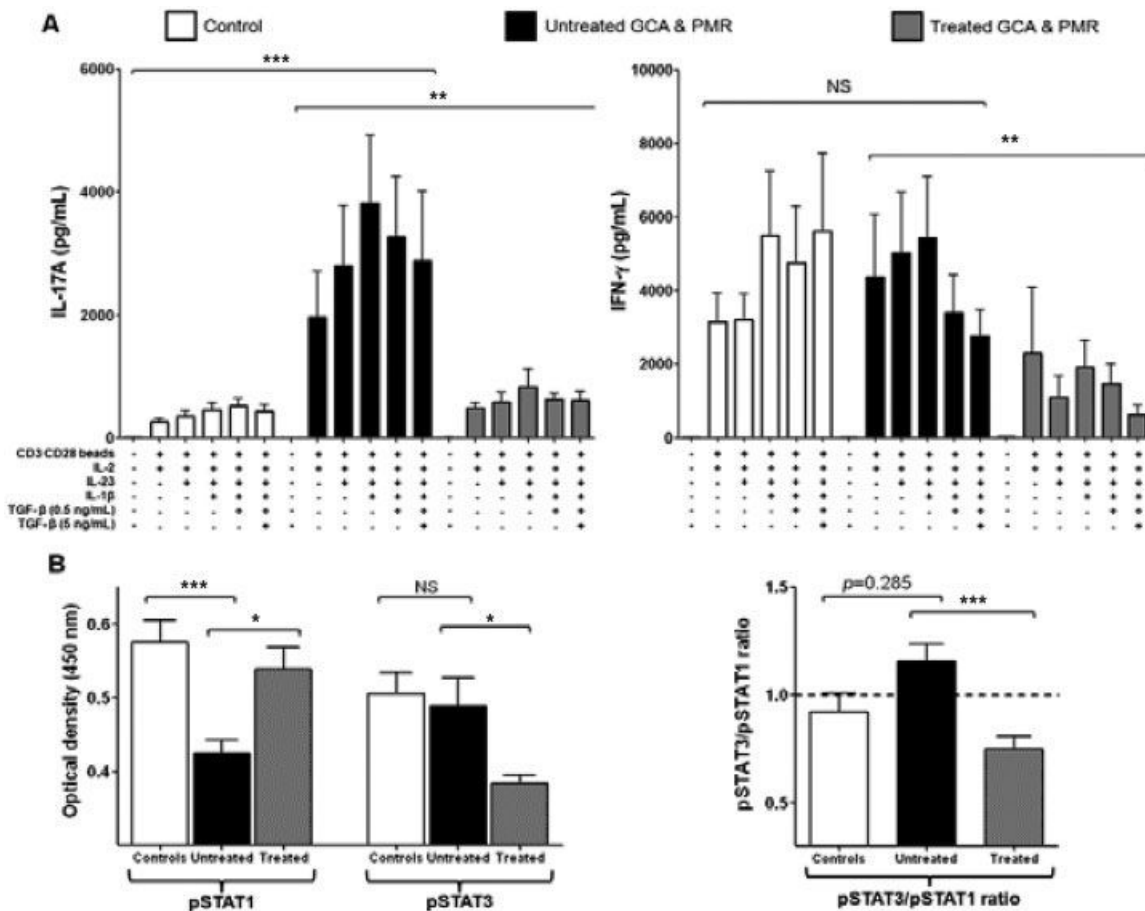
corrected the Th17 cell-to-Treg cell imbalance observed in patients with GCA and patients with PMR.

**Number and phenotype of Th17 precursor cells in patients with GCA or PMR and healthy individuals.** The heterogeneity and plasticity of the Th17 cell subset require complementary phenotypic and functional analyses. In our study, most of the CD4+IL-17+ cells expressed CCR6 and CD161 and often produced TNF $\alpha$  and more rarely IFN $\gamma$ , without any difference between groups. Th17 cells were, in most cases, memory T cells (CD45RA-).

Because it has been reported that human Th17 lymphocytes differentiate from CD161+CD4+ precursor cells (15), we sought to further analyze possible differences in the number and phenotype of these cells in patients with GCA and patients with PMR. The frequency of CD161-expressing cells in total CD4+ T lymphocytes did not differ significantly between patients and healthy control subjects (Figure 5A), and glucocorticoid therapy did not modify the numbers of these cells (Figure 5B). Further analysis indicated that these CD161+CD4+ cells exhibited a phenotype consistent with that of memory CD4+ T cells, because they did not express CD45RA. No difference was observed between groups regarding CD45RA expression by CD161+CD4+ cells. Furthermore, most of the CD161+CD4+ cells expressed CCR6, which is the receptor for CCL20. Interestingly, the expression of CCR6 was higher in untreated patients than in healthy control subjects ( $P = 0.0328$ ) but was not significantly modified by glucocor-

ticoid therapy ( $P = 0.0748$ ) (additional information is available upon request from the corresponding author).

**Effect of functional differences in CD161+CD4+ T cells on the Th17 cell response observed in GCA and PMR.** Although the number of IL-17+ lymphocytes was increased in patients with GCA or PMR, we did not detect any quantitative difference in the percentage of CD161+CD4+ T cells between patients and control subjects. To seek an explanation for this, we assessed the correlation between IL-17+CD4+ cells and CD161+CD4+ cells in the different groups. When patients and control subjects were analyzed together ( $n = 89$ ), we observed a positive correlation ( $R^2 = 0.21$ ,  $P < 0.0001$ ) between IL-17+CD4+ cells and CD161+CD4+ cells. When the groups were analyzed separately, a stronger correlation was established between IL-17+CD4+ cells and CD161+CD4+ cells ( $R^2 = 0.40$ ,  $P = 0.0001$  for untreated patients;  $R^2 = 0.52$ ,  $P < 0.0001$  for healthy control subjects;  $R^2 = 0.45$ ,  $P = 0.0074$  for treated patients) (additional information is available upon request from the corresponding author). The correlation coefficient was significantly different between control subjects and untreated patients ( $P < 0.0001$ ) but did not differ between treated patients and control subjects ( $P = 0.164$ ). Interestingly, flow cytometric analysis revealed that the frequency of IL-17+ cells among CD161+CD4+ cells was 2-fold higher in patients with PMR or GCA than in healthy control subjects (mean 6.53% versus 3.03%;  $P < 0.0001$ ). After treat-



**Figure 6.** Functional study of circulating CD161+CD4+ T cells. **A**, Production of interleukin-17 (IL-17) and interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) by CD161+CD4+ T cells isolated from untreated GCA and PMR patients ( $n = 12$ ), treated patients ( $n = 10$ ), and control subjects ( $n = 12$ ). CD161+CD4+ T cells were cultured with or without anti-CD3 and anti-CD28 microbeads, IL-23 (50 ng/ml), IL-1 $\beta$  (50 ng/ml), IL-2 (25 IU/ml), and transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) (0.5 or 5 ng/ml). The supernatant was collected after 72 hours of culture. IL-17 and IFN $\gamma$  expression was quantified using Luminex technology. **B**, Level of pSTAT-1 and pSTAT-3 in freshly isolated CD161+CD4+ T cells from untreated patients ( $n = 12$ ), control subjects ( $n = 12$ ), and treated patients ( $n = 14$ ), as assessed after whole cell protein extraction. The pSTAT-3:pSTAT-1 ratio was calculated for all patients in each group. Bars show the mean  $\pm$  SEM. \* =  $P < 0.05$ ; \*\* =  $P < 0.01$ ; \*\*\* =  $P < 0.001$ , by Kruskal-Wallis test (**A**) or Mann-Whitney U test (**B**). See Figure 1 for other definitions.

ment, we observed a significant decrease in this frequency (from 6.53% to 3.65%;  $P < 0.001$ ) (Figure 5C).

Confirming these results, CD161+CD4+ T lymphocytes isolated from untreated patients produced 6.3–8.5-fold more IL-17 than those isolated from control subjects ( $P < 0.0001$ ) after 72 hours of culture (Figure 6A). The level of IL-17 in the supernatant was the highest when IL-23 and IL-1 $\beta$  were added, whereas TGF $\beta$  hindered IL-17 production in a dose-dependent manner. When CD161+CD4+ lymphocytes from patients with GCA or PMR were stimulated through their T cell receptor (TCR; anti-CD3/CD28 microbeads) plus IL-2, they still produced 4-fold the level of IL-17 secreted by CD161+CD4+ cells from healthy control

subjects activated with the same signals plus the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-23 ( $P = 0.019$ ) (Figure 6A). CD161+CD4+ cells also produced high levels of IFN $\gamma$ , especially when IL-1 $\beta$  was added to the medium, whereas IFN $\gamma$  expression was inhibited in a dose-dependent manner by TGF $\beta$ . Interestingly, the level of IFN $\gamma$  did not differ between untreated patients and control subjects (Figure 6A). The TNF $\alpha$  production by activated CD161+CD4+ lymphocytes was also assessed and was similar in patients with GCA or PMR and control subjects (results not shown). After 3 months of glucocorticoid therapy, a significant decrease in the production of IL-17 was observed, so that IL-17 production by activated CD161+CD4+ T cells isolated from



treated patients was normalized and did not differ significantly from that by cells from healthy control subjects (Figure 6A). Moreover, the ability of CD161+CD4+ T cells to produce IFN $\gamma$  was significantly decreased after steroid therapy ( $P = 0.0069$ ) (Figure 6A).

Expression of CD161 was assessed in temporal artery biopsy specimens. CD161+ T cells massively infiltrated the 3 layers of GCA arteries and represented the vast majority of the infiltrating lymphocytes. Interestingly, a close association was observed between the cells stained with anti-CD3, anti-IL-17, anti-IFN $\gamma$ , and anti-CD161 antibodies (Figures 3A and E–G). Furthermore, double staining of IFN $\gamma$  and CD161 showed that ~50% of IFN $\gamma$ -producing cells expressed CD161, highlighting their Th17 cell origin (Figure 3H).

The relative phosphorylation status of the transcription factors STAT-1 and STAT-3 contributes to the programming of Th17 cell differentiation. STAT-3 is activated under the IL-6 pathway and induces IL-17 polarization of T cells, whereas phosphorylation of STAT-1 impairs Th17 cell differentiation. The level of the phosphorylated forms of STAT-1 and STAT-3 in freshly isolated CD161+CD4+ T cells from untreated or treated patients and from control subjects was therefore assessed. The level of intracellular pSTAT-1 was significantly decreased in untreated patients compared with control subjects ( $P = 0.0009$ ), but the level of pSTAT-3 was not modified ( $P = 0.5834$ ) (Figure 6B). After 3 months of glucocorticoid therapy, the level of pSTAT-1 significantly increased ( $P = 0.0193$ ), whereas pSTAT-3 expression decreased ( $P = 0.0145$ ) (Figure 6B). The relative phosphorylation status of STAT-3 and STAT-1 was evaluated by determining the pSTAT-3:pSTAT-1 ratio, which was slightly increased in untreated patients and normalized after glucocorticoid therapy ( $P = 0.0009$ ) (Figure 6B).

## DISCUSSION

Here, we demonstrated that GCA and PMR are associated with an imbalance between proinflammatory Th17 cells and immunosuppressive Treg lymphocytes. This study is the first to show that although the suppressive activity of circulating Treg cells is not altered, the number of circulating Treg cells is decreased in patients with GCA or PMR. We also confirmed that the numbers of Th17 lymphocytes are significantly increased in patients with GCA (8) and reported for the first time this finding in PMR. Th17 cells are inducers of chronic inflammation through production of IL-17, which acti-

vates many cells expressing its receptor, such as DCs, macrophages, endothelial cells, and smooth muscle cells. These cells are involved in the arterial tissue damage that occurs in GCA (6,10). In contrast with findings in previous studies (8,9), we detected a lower percentage of circulating Th1 cells in patients with GCA or PMR compared with healthy control subjects. This discrepancy may be explained by a technical artifact. In most of the previous studies assessing Th1 and Th17 cells, staining was performed on PMA-stimulated PBMCs. PMA stimulation is known to trigger internalization and degradation of CD4 (19). As a result, it is difficult to define CD4+ T cell populations to analyze T helper cell subsets. To overcome this pitfall, we isolated CD4+ T lymphocytes before PMA stimulation.

The imbalance between proinflammatory and antiinflammatory CD4+ T lymphocytes was confirmed in situ: in patients with GCA, we detected strong T cell and macrophage infiltration in all layers of the artery, especially between the adventitia and the media. These T cells were mainly Th1 and Th17 cells, whereas almost no Treg cells were detected. Th1 lymphocytes infiltrated the wall of the temporal arteries of patients with GCA, which is consistent with the presence of macrophages and granulomas that are typically observed in GCA (1,7). In accordance with previous reports (1,7), neither lymphocytes nor macrophages were detected in temporal artery biopsy specimens from patients with PMR.

Glucocorticoids are the standard and highly efficient therapy used to treat the symptoms of GCA and PMR. In the current study, we determined that this treatment resulted in significant clinical and biologic improvement in all patients. However, glucocorticoids were not able to completely restore T cell homeostasis. Although the frequency of Th17 cells was decreased, the initial defect in the circulating Treg cell number persisted despite steroid treatment. This partial correction of Th17 cell/Treg cell imbalance may explain why most patients require prolonged steroid therapy to avoid relapses. The balance between Th17 cells and Treg cells is regulated by IL-6 (20,21), a cytokine that is significantly associated with the activity of GCA and PMR (22), as we also observed in this study. Consequently, IL-6 has to be considered as a promising therapeutic target to restore T cell homeostasis in GCA and PMR. However, the decrease in IL-6 concentration observed after steroid therapy was not associated with a correction of the Treg cell level, suggesting that other factors, such as the specific effects of glucocorticoids on Treg cells, may also be involved.

Human Th17 cells have been shown to differen-

tiate exclusively from a small subset of T cells, defined by a CD161+CD4+ phenotype, in response to stimulation with IL-23 and IL-1 $\beta$  (10,12,13,15). An increase in CD161 expression on Th17 cells has been shown in inflammatory disorders (23). Here, we confirmed that CD161+CD4+ T cell precursors were characterized by a memory phenotype (CD45RA $^{-}$ ) and by the expression of CCR6 (15,24). CCR6 is the receptor of CCL20, a chemokine that is produced by activated DCs (25) and Th17 cells (10,26) and is involved in the homing of CCR6+CD4+ T cells, leading to the development of GCA lesions (6,25). Due to CCR6 expression, CD161+CD4+ cells are recruited into the wall of the arteries and differentiate into Th17 cells and Th1 cells. Whereas these cells represent only 10% of circulating CD4+ T cells, we observed a massive infiltration of GCA arteries by CD161+CD4+ T cells that simultaneously produced IL-17 and IFN $\gamma$ , both in temporal artery biopsy specimens and in *in vitro* cultures, confirming the plasticity of CD161+CD4+ T cells that can differentiate into Th1 cells and Th17 cells (15,27). We also demonstrated for the first time that CD161+CD4+ cells from untreated patients with GCA or PMR were much more potent producers of IL-17 than were those from control subjects, and that this was corrected after glucocorticoid therapy.

Artery-infiltrating Th1 cells may originate from direct polarization of naive CD4+ T cells or from local differentiation of Th17 cells into Th1/Th17 or Th1 cells in the presence of IL-12, as has been reported previously. The interaction between Th1 cells and Th17 cells is complex, but Th17 cells are able to induce IL-12 and IL-23 production by DCs, leading to Th17 cell lineage enrichment and the conversion of some Th17 cells into Th1 cells in a mouse model of colitis (30). In the current study, the fact that >50% of Th1 cells in temporal artery biopsy specimens expressed CD161 provides evidence for Th1 cell polarization from Th17 cells and Th1/Th17 cells in the presence of IL-12, as was recently observed in juvenile idiopathic arthritis (27). This close link between Th1 cells and Th17 cells toward a common precursor (CD161+CD4+ T cells) has never been reported before and could be of great interest in the development of new therapeutic targets in GCA.

To decipher why CD161+CD4+ cells isolated from untreated patients versus control subjects or treated patients were much more potent producers of IL-17 after TCR activation, we assessed the phosphorylation status of STAT-3, which is involved in Th17 cell differentiation through IL-6 signaling (10,26,31), and of STAT-1, which impairs Th17 cell polarization through IFN $\gamma$  and IL-27 signaling (29,31–34). In the present

study, baseline Th17 cell polarization of CD161+CD4+ T cells from patients with GCA or PMR was related to a decrease in intracellular levels of pSTAT-1, which is consistent with a recent study in which STAT-1–deficient T cells preferentially polarized into Th17 cells during systemic inflammation (35). Indeed, although IL-6 expression was increased in the serum of untreated patients, the level of pSTAT-3 in CD161+CD4+ cells was not different between untreated patients and control subjects. However, the pSTAT-3:pSTAT-1 ratio was increased (ratio >1) in untreated patients, leading to increased Th17 cell polarization. In contrast, the ratio was well balanced (ratio  $\approx$  1) in control subjects and in favor of STAT-1 (ratio <1) in treated patients, which was related to impaired Th17 cell differentiation.

Interestingly, no difference was observed between patients with GCA and patients with PMR concerning Treg cells, Th17 cells, and CD161+CD4+ T cells. This suggests that GCA and PMR represent the same disease with distinct clinical forms but a similar pathogenesis, implicating an imbalance between Th17 cells and Treg cells and baseline activation of circulating CD161+CD4+ T cells associated with an imbalance between pSTAT-1 and pSTAT-3. CD161+CD4+ T cells and cytokines involved in the regulation of Th17 cell polarization through STAT-1 or STAT-3 phosphorylation, such as IL-6, IFN $\gamma$ , or IL-27, have to be considered as potential promising therapeutic targets for the treatment of GCA.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Philip Bastable for help in writing the manuscript and Corinne Chevalier for help in collecting the data. We also thank all of the patients and healthy control subjects who participated in this study. We are grateful to staff of the Plateforme de Cytométrie, Institut Fédératif de Recherche 100, Université de Bourgogne, Bourgogne, France, for performing the flow cytometry experiments and analyzing the results.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Dr. Bonnotte had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

**Study conception and design.** Samson, Audia, Fraszczak, Trad, Ciudad, Martin, Janikashvili, Bonnotte.

**Acquisition of data.** Samson, Audia, Fraszczak, Trad, Ornetti, Lakomy, Ciudad, Leguy, Berthier, Vinit, Manckoundia, Maillefert, Besancenot, Olsson, Lorcerie, Guillevin, Janikashvili, Bonnotte.

**Analysis and interpretation of data.** Samson, Audia, Ciudad, Aho-Glele, Guillevin, Mouthon, Saas, Bateman, Janikashvili, Larmonier, Bonnotte.

## REFERENCES

- Salvarani C, Cantini F, Hunder GG. Polymyalgia rheumatica and giant-cell arteritis. *Lancet* 2008;372:234–45.
- Mahr AD, Jover JA, Spiera RF, Hernandez-Garcia C, Fernandez-Gutierrez B, Lavalley MP, et al. Adjunctive methotrexate for treatment of giant cell arteritis: an individual patient data meta-analysis. *Arthritis Rheum* 2007;56:2789–97.
- Hoffman GS, Cid MC, Rendt-Zagar KE, Merkel PA, Weyand CM, Stone JH, et al. Infliximab for maintenance of glucocorticosteroid-induced remission of giant cell arteritis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007;146:621–30.
- Salvarani C, Macchioni P, Manzini C, Paolazzi G, Trotta A, Manganelli P, et al. Infliximab plus prednisone or placebo plus prednisone for the initial treatment of polymyalgia rheumatica: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007;146:631–9.
- Ly KH, Regent A, Tamby MC, Mouthon L. Pathogenesis of giant cell arteritis: more than just an inflammatory condition? *Autoimmun Rev* 2010;9:635–45.
- Piggott K, Bioussé V, Newman NJ, Goronzy JJ, Weyand CM. Vascular damage in giant cell arteritis. *Autoimmunity* 2009;42:596–604.
- Weyand CM, Goronzy JJ. Medium- and large-vessel vasculitis. *N Engl J Med* 2003;349:160–9.
- Deng J, Younge BR, Olshen RA, Goronzy JJ, Weyand CM. Th17 and Th1 T-cell responses in giant cell arteritis. *Circulation* 2010;121:906–15.
- Weyand CM, Younge BR, Goronzy JJ. IFN- $\gamma$  and IL-17: the two faces of T-cell pathology in giant cell arteritis. *Curr Opin Rheumatol* 2011;23:43–9.
- Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009;361:888–98.
- Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 2008;223:87–113.
- Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunol* 2008;20:1361–8.
- Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007;204:1849–61.
- Bettini M, Vignali DA. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2009;21:612–8.
- Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, et al. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med* 2008;205:1903–16.
- Evans JM, Hunder GG. Polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2000;26:493–515.
- Hunder GG, Bloch DA, Michel BA, Stevens MB, Arend WP, Calabrese LH, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1122–8.
- Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009;30:899–911.
- Hennessy B, North J, Deru A, Llewellyn-Smith N, Lowdell MW. Use of Leu3a/3b for the accurate determination of CD4 subsets for measurement of intracellular cytokines. *Cytometry* 2001;44:148–52.
- Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor- $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 2007;8:942–9.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235–8.
- Roche NE, Fulbright JW, Wagner AD, Hunder GG, Goronzy JJ, Weyand CM. Correlation of interleukin-6 production and disease activity in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1993;36:1286–94.
- Kleinschek MA, Boniface K, Sadokova S, Grein J, Murphy EE, Turner SP, et al. Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *J Exp Med* 2009;206:525–34.
- Takahashi T, Dejbakhsh-Jones S, Strober S. Expression of CD161 (NKR-P1A) defines subsets of human CD4 and CD8 T cells with different functional activities. *J Immunol* 2006;176:211–6.
- Deng J, Ma-Krupa W, Gewirtz AT, Younge BR, Goronzy JJ, Weyand CM. Toll-like receptors 4 and 5 induce distinct types of vasculitis. *Circ Res* 2009;104:488–95.
- Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008;453:1051–7.
- Cosmi L, Cimaz R, Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Borriello F, et al. Evidence of the transient nature of the Th17 phenotype of CD4+CD161+ T cells in the synovial fluid of patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2011;63:2504–15.
- Annunziato F, Romagnani S. Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Res Ther* 2009;11:257.
- Peck A, Mellins ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology* 2010;129:147–53.
- Feng T, Qin H, Wang L, Benveniste EN, Elson CO, Cong Y. Th17 cells induce colitis and promote Th1 cell responses through IL-17 induction of innate IL-12 and IL-23 production. *J Immunol* 2011;186:6313–8.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:485–517.
- Batten M, Li J, Yi S, Kljavin NM, Danilenko DM, Lucas S, et al. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 2006;7:929–36.
- Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM, et al. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* 2006;7:937–45.
- Tanaka K, Ichiyama K, Hashimoto M, Yoshida H, Takimoto T, Takaesu G, et al. Loss of suppressor of cytokine signaling 1 in helper T cells leads to defective Th17 differentiation by enhancing antagonistic effects of IFN- $\gamma$  on STAT3 and Smads. *J Immunol* 2008;180:3746–56.
- Villarino AV, Gallo E, Abbas AK. STAT1-activating cytokines limit Th17 responses through both T-bet-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 2010;185:6461–71.

## **SUPPLEMENTARY MATERIAL**

### **SUPPLEMENTARY TABLES**

**Table S1.** Demographical and clinical characteristics of GCA and PMR patients.

	Untreated GCA	Untreated PMR
<b>DEMOGRAPHIC</b>		
Number of subjects (female/male)	22 (14/8)	12 (8/4)
Age, mean $\pm$ SEM	75.17 $\pm$ 2.43	76.47 $\pm$ 1.75
<b>CLINICAL SYMPTOMS</b>		
Headache, %	63.6%	0,0%
Jaw claudication, %	63.6%	0,0%
Scalp tenderness, %	40.9%	0,0%
Temporal artery abnormality*, %	81.8%	0,0%
Anterior ischemic optic neuropathy, %	13.6%	0,0%
Fever, %	36.4%	33.33%
Weight loss, %	59.1%	41.67%
Fatigue, %	72.7%	50,0%
Polymyalgia rheumatica, %	40.9%	100,0%
<b>COMPLEMENTARY INVESTIGATION</b>		
Hemoglobin (g/dL), mean $\pm$ SEM	10.84 $\pm$ 0.44	11.00 $\pm$ 0.42
ESR (mm at one hour), mean $\pm$ SEM	92.32 $\pm$ 11.94	65.67 $\pm$ 6.43
CRP (mg/L), mean $\pm$ SEM	61.14 $\pm$ 4.21	87.15 $\pm$ 13.39

\* Temporal artery tenderness to palpation or decreased pulsation, unrelated to arteriosclerosis of cervical arteries. CRP: C-reactive protein, ESR: erythrocyte sedimentation rate. GCA: giant cell arteritis. PMR: polymyalgia rheumatica. SEM: standard error of the mean.

**Table S2:** General characteristics of untreated patients and controls.

	GCA and PMR (mean $\pm$ SEM)	Controls (mean $\pm$ SEM)	<i>p</i> value
<b>Number of subjects</b>	<b>34</b>	<b>31</b>	
Sex, female/male	22/12	22/9	
Age (years)	75.63 $\pm$ 1.67	73.86 $\pm$ 1.63	0.41
Hemoglobin (g/dL)	10.90 $\pm$ 0.32	13.31 $\pm$ 0.25	<0.0001
Lymphocytes (G/L)	1.49 $\pm$ 0.12	1.84 $\pm$ 0.13	0.0215
CD3 <sup>+</sup> (G/L)	1.06 $\pm$ 0.08	1.42 $\pm$ 0.11	0.014
CD4 <sup>+</sup> (G/L)	0.80 $\pm$ 0.06	0.93 $\pm$ 0.08	0.28
CD8 <sup>+</sup> (G/L)	0.24 $\pm$ 0.03	0.43 $\pm$ 0.05	0.0008
CRP (mg/L)	90.5 $\pm$ 8.94	3.46 $\pm$ 0.22	<0,0001
ESR (mm at one hour)	62.79 $\pm$ 3.51	18.10 $\pm$ 2.82	<0,0001
Fibrinogen (g/L)	6.98 $\pm$ 0.22	3.61 $\pm$ 0.12	<0,0001

CRP: C-reactive protein, ESR: erythrocyte sedimentation rate. GCA: giant cell arteritis. PMR: polymyalgia rheumatica. SEM: standard error of the mean. Statistical analysis: Mann Whitney U test.

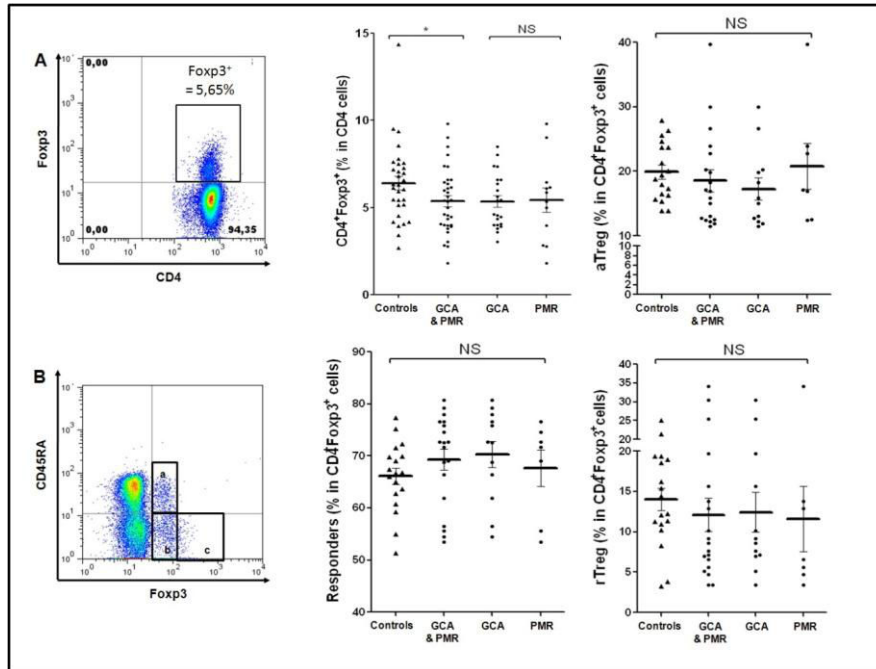
**Table S3: Characteristics of 27 untreated and treated paired GCA (n=18) and PMR (n=9) patients.**

	Untreated GCA & PMR (mean±SEM)	Treated GCA & PMR (mean±SEM)	<i>p</i> value
Number of subjects	27 paired patients		
Dose of prednisone (mg/day)	0	17.5±1.5	
Hemoglobin (g/dL)	10.66±0.33	13.19±0.30	<b>&lt;0.0001</b>
Leucocytes (G/L)	8.24±0.37	9.91±0.52	<b>0.0022</b>
Neutrophils (G/L)	5.77±0.33	7.35±0.47	<b>0.002</b>
Lymphocytes (G/L)	1.43±0.10	1.93±0.25	0.0678
CD3 <sup>+</sup> (G/L)	1.06±0.08	1.42±0.20	0.1153
CD4 <sup>+</sup> (G/L)	0.80±0.07	1.08±0.17	0.1952
CD8 <sup>+</sup> (G/L)	0.24±0.03	0.33±0.05	0.0674
CRP (mg/L)	93.56±10.29	4.97±0.67	<b>&lt;0.0001</b>
ESR (mm at one hour)	61.89±4.13	18.26±2.89	<b>&lt;0.0001</b>
Fibrinogen (g/L)	7.02±0.25	3.63±0.19	<b>&lt;0.0001</b>

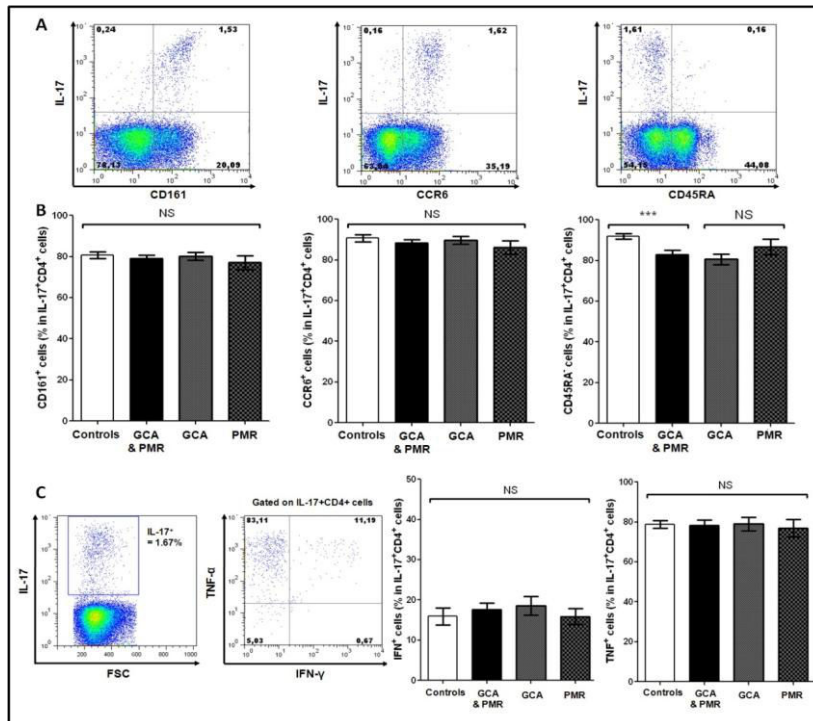
CRP: C-reactive protein, ESR: erythrocyte sedimentation rate. GCA: giant cell arteritis. PMR: polymyalgia rheumatica. SEM: standard error of the mean. Statistical analysis: Wilcoxon matched pairs signed rank test



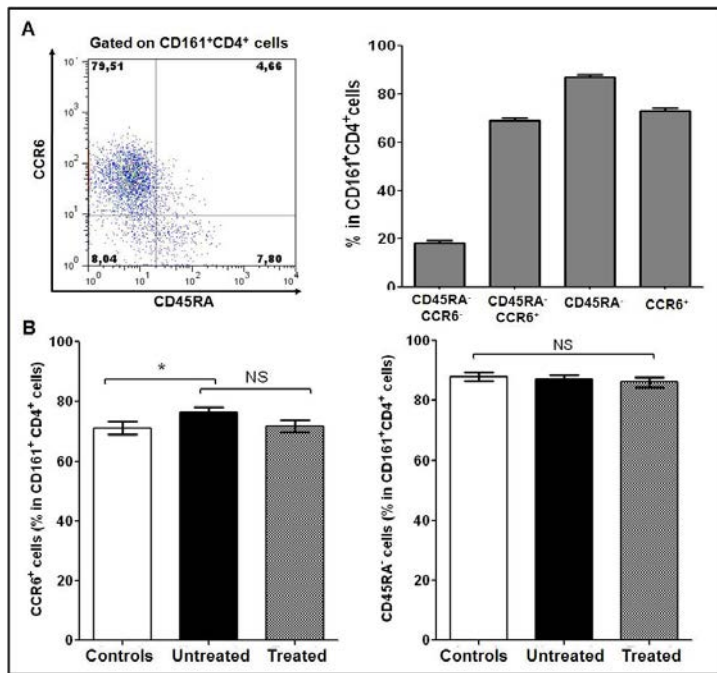
## SUPPLEMENTARY FIGURES



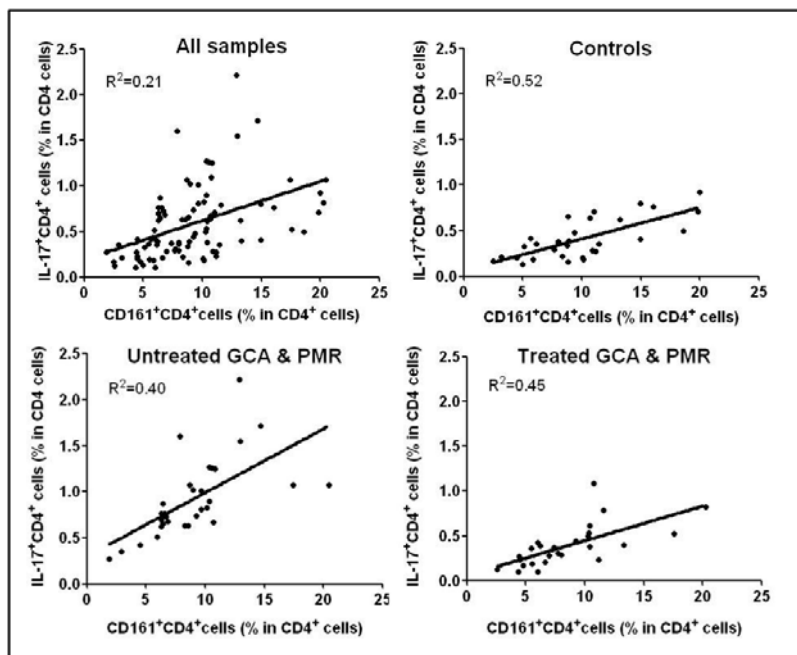
**Supplementary figure S1: Flow cytometry analysis of subsets of Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells.** **A:** Phenotypic analysis of circulating Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells in patients (n=34) and controls (n=31). **B:** Phenotypic analysis of the different subsets of Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells: active Treg (aTreg) (CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>high</sup>CD45RA<sup>+</sup>) in gate c, resting Treg (rTreg) (CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>low</sup>CD45RA<sup>+</sup>) in gate a, and responder T cells (CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>low</sup>CD45RA<sup>+</sup>) in gate b in 19 patients (12 GCA and 7 PMR) and 18 controls. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ , using the Mann Whitney U test (Kruskal-Wallis when >2 groups). NS: not statistically significant. Horizontal bars represent the mean and error bars the standard error of the mean (SEM).



**Supplementary figure 2: flow cytometry analysis of IL-17<sup>+</sup> T cell subsets.** **A:** Flow cytometry analysis of one representative GCA patient. Th17 cells were defined by a CD45RA<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> phenotype. **B:** percentage of CCR6<sup>+</sup>, CD161<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> cells in total IL-17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells from GCA (n=20), PMR (n=11) patients and healthy subjects (n=31). **C:** Flow cytometry analysis of the production of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  by Th17 cells of GCA and PMR patients in comparison with controls. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ , using the Mann Whitney U test. NS: not statistically significant. Histograms represent the mean and error bars the standard error of the mean (SEM).



**Supplementary figure 3: Phenotypic study of circulating CD161<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells.** **A:** Flow cytometry analysis of the phenotype of circulating CD161<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells (all samples, n=90) **B:** Comparison of the phenotype of circulating CD161<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells between untreated GCA and PMR patients (n=32), treated GCA and PMR patients (n=27) and controls (n=31). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ , using the Mann Whitney U test. NS: not statistically significant. Horizontal bars represent the mean and error bars the SEM.



**Supplementary figure 4: Correlative analysis of CD161<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T cells.** Linear regression analyses were used to study the correlation between the flow cytometry determined percentages of circulating CD161<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and IL-17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells. The linear regression model, with the corresponding  $R^2$  value, is represented for all samples (n=89) untreated patients (n=32), treated patients (n=26) and controls (n=31).

### **3. Article 2: “Treg cells in giant cell arteritis: might they be another target for adjuvant treatments? Comment on the article by Samson *et al.* Reply”**

Les corticoïdes sont la pierre angulaire du traitement de l'ACG. Néanmoins, et pour prévenir la survenue d'une ostéoporose cortico-induite, la majorité des patients reçoivent également une supplémentation en calcium et en vitamine D, et parfois des bisphosphonates. Dans une lettre de réponse [366] à l'article 1 [83], F. J. Fernández *et al.* rappellent que la vitamine D possède des effets immunomodulateurs pouvant influencer la balance Th17/Treg. En effet, Zold *et al.* [367] ont montré chez des patients présentant une connectivite indifférenciée que l'alfacalciférol permettait de diminuer les concentrations sériques d'IL-6, d'IL-17, d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$ , de diminuer les pourcentages de lymphocytes Th1 et Th17 circulants et, à l'inverse, d'augmenter le pourcentage de Treg circulants.

Parmi les 27 patients pour qui deux prélèvements avaient été obtenus au cours de l'étude rapportée dans l'article 1 [83], nous avons recensé les traitements préventifs de l'ostéoporose qui avaient été associés à la corticothérapie. Aucun de nos patients n'a reçu d'alfacalciférol, 85% ont reçu une supplémentation calcique et 93% en vitamine D sous forme de cholecalciférol.

Néanmoins, la forme métaboliquement active du cholecalciférol (1,25-(OH)<sub>2</sub>-cholecalciférol) est également capable d'inhiber les réponses Th1 et Th17 et de promouvoir la réponse Treg en association avec l'IL-2 [368]. Ainsi, il est impossible d'exclure que la vitamine D donnée à nos patients ait joué un rôle dans la diminution de la réponse Th17. Cependant, nous n'avons observé aucun effet sur les Treg, ce qui rend cette hypothèse peu probable. De plus, le déséquilibre de la balance Th17/Treg au cours de l'ACG est probablement plus lié aux fortes concentrations d'IL-6 observées au cours de cette pathologie [116,248], plutôt qu'à une carence en vitamine D.



hormone might have a role in adjuvant therapy for patients with GCA.

Francisco José Fernández-Fernández, MD  
*Hospital Arquitecto Marcide  
 Ferrol, Spain*

1. Samson M, Audia S, Fraszczak J, Trad M, Ornetti P, Lakomy D, et al. Th1 and Th17 lymphocytes expressing CD161 are implicated in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica pathogenesis. *Arthritis Rheum* 2012;64:3788–98.
2. Schacht E. Osteoporosis in rheumatoid arthritis—significance of alfacalcidol in prevention and therapy. *Z Rheumatol* 2000;59 Suppl 1:10–20.
3. Zold E, Szodoray P, Nakken B, Barath S, Kappelmayer J, Csathy L, et al. Alfacalcidol treatment restores derailed immune-regulation in patients with undifferentiated connective tissue disease. *Autoimmun Rev* 2011;10:155–62.
4. Ringe JD, Faber H, Fahramand P, Schacht E. Alfacalcidol versus plain vitamin D in the treatment of glucocorticoid/inflammation-induced osteoporosis. *J Rheumatol Suppl* 2005;76:33–40.

DOI 10.1002/art.37699

## Reply

*To the Editor:*

We thank Dr. Fernández-Fernández for his interesting comments regarding our work on the implication of Th1 and Th17 cells in GCA and polymyalgia rheumatica (PMR). As mentioned, glucocorticoids remain the cornerstone of the treatment of GCA and PMR, and to prevent osteoporosis, most patients receive calcium and vitamin D supplements and some patients receive bisphosphonates. Dr. Fernández-Fernández suggested that these drugs may have an effect on the Treg/Th17 cell balance. This hypothesis was supported by the results of a study by Zold et al, which demonstrated that 1.0 µg/day of alfacalciferol decreased the concentrations of IL-6, IL-17, IL-12, and interferon-γ, as well as the percentages of circulating Th1 and Th17 cells, in plasma, whereas it increased the number of circulating Treg cells and restored their suppressive activity (1). Among the 27 patients from whom 2 paired samples were obtained in our study, 23 (85.2%) actually received supplements of calcium carbonate at ≥1 gm/day and 25 (92.6%) received vitamin D (cholecalciferol in all cases) at a standard dosage of 880 IU/day. It is worth noting that none of the 27 patients received alfacalciferol. However, other studies have demonstrated that 1,25-dihydroxycholecalciferol, the active form of vitamin D, also decreased Th1 and Th17 immune responses and promoted the development of Treg cells in combination with IL-2 (2).

We cannot totally discount the notion that vitamin D could have played a role in the modulation of T cell polarization in our study. However, we did not observe any correction in the frequency of Treg cells or their suppressive function after treatment, unlike the results seen in patients receiving alfacalcidol or 1,25-dihydroxycholecalciferol (1,2). Furthermore, GCA is associated with a very high level of IL-6, which plays a major role in control of the Th17/Treg balance (3,4). In the study by Zold et al, patients had undifferentiated connec-

DOI 10.1002/art.37700

## Treg cells in giant cell arteritis: might they be another target for adjuvant treatment? Comment on the article by Samson et al

*To the Editor:*

I read with great interest the excellent article by Samson et al (1). Among other findings, the report describes a decrease in the number of circulating Treg cells in patients with giant cell arteritis (GCA) and polymyalgia rheumatica.

Glucocorticoids are still the mainstay of therapy in patients with GCA. However, the long duration of treatment causes serious, dose-related side effects. Patients with GCA are treated with calcium, vitamin D, and commonly, bisphosphonates for prevention of osteoporosis.

Alfacalcidol, a vitamin D hormone preparation, which unlike vitamin D<sub>2</sub> or D<sub>3</sub>, has immunoregulatory effects in vitro and in vivo, inhibits the cytokines interleukin-1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor α, and particularly IL-12. At the cellular level, alfacalcidol reduces the expression of Th1 cells directly or indirectly by inhibition of IL-12 derived from monocytes (2). Zold et al (3) investigated the effects of alfacalcidol in modifying Treg cell functions in patients with undifferentiated connective tissue disease, and they found that alfacalcidol repaired the natural Treg (nTreg)/Th17 balance and raised the capacity of nTreg cells to suppress the proliferation of autologous CD4+CD25− cells. It might be of interest to investigate the value of alfacalcidol in the prevention of glucocorticoid-induced osteoporosis (4) and to study whether this vitamin D

tive tissue disease with much lower IL-6 concentrations (1). Nevertheless, the hypothesis suggested by Dr. Fernández-Fernández is of particular interest and should be evaluated in further studies regarding GCA and PMR treatment.

Maxime Samson, MS  
Bernard Bonnotte, MD, PhD  
*University of Burgundy  
and University Hospital  
Dijon, France  
INSERM UMR1098  
Besançon, France*

1. Zold E, Szodoray P, Nakken B, Barath S, Kappelmayer J, Csathy L, et al. Alfacalcidol treatment restores derailed immune-regulation in patients with undifferentiated connective tissue disease. *Autoimmun Rev* 2011;10:155–62.
  2. Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol* 2009;183:5458–67.
  3. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235–8.
  4. Roche NE, Fulbright JW, Wagner AD, Hunder GG, Goronzy JJ, Weyand CM. Correlation of interleukin-6 production and disease activity in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1993;36:1286–94.
-

#### **4. Article 3: “Functionally relevant Treg cells are present in giant cell arteritis lesions: comment on the article by Samson *et al.* Reply”**

Dans une lettre [369] en réponse à l'article 1 [83], M. Corbera-Bellalta *et al.* mettent en perspective les résultats que nous avons obtenus concernant la réponse T régulatrice au cours de l'ACG et ceux d'une étude récente où ils ont montré que le niveau d'expression de FoxP3, mesuré par PCR dans les parois d'artères temporales, était augmenté chez des patients atteints d'ACG comparativement à des sujets sains, puis diminuait après traitement par corticoïdes [370].

Dans notre étude [83], nous avons également mis en évidence un infiltrat par des LT FoxP3<sup>+</sup> dans les lésions d'ACG, mais ces derniers étaient extrêmement minoritaires en comparaison à l'intensité de l'infiltrat en lymphocytes Th1 et Th17. En outre, nous avons aussi montré au cours de l'ACG, qu'un ratio Treg:Teff d'au moins 1:2 était nécessaire *in vitro* pour observer un effet suppresseur des Treg. Ainsi, même si quelques LT exprimant FoxP3 sont détectés dans la paroi des patients atteints d'ACG, ils ne sont sûrement pas en nombre suffisant pour qu'une réponse T régulatrice efficace puisse se développer.

De plus, et comme nous l'avons déjà évoqué, l'expression de FoxP3 ne suffit pas à définir les Treg puisque FoxP3 peut être exprimé de manière transitoire par des LT effecteurs dépourvus de fonction régulatrice [328]. Ainsi, le niveau d'expression de FoxP3 dans la paroi artérielle n'est pas suffisant pour mesurer la réponse T régulatrice présente dans les lésions d'ACG et peut simplement refléter l'intensité de l'infiltrat lymphocytaire T (Treg ou non) : massif au diagnostic de l'ACG, plus faible après corticothérapie et absent chez des sujets sains.

Dans la même étude, les auteurs ont mis en évidence dans les lésions d'ACG des LT exprimant FoxP3 et produisant de l'IL-17, ce qui est le reflet de la plasticité des Treg vers la voie Th17 [364]. Ces LT FoxP3<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> ne sont probablement pas suppresseurs. En effet, il est clairement démontré que ceux sont essentiellement les LT CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>FoxP3<sup>low</sup>, dépourvus de fonction suppressive, qui produisent des cytokines pro-inflammatoires (IFN-γ et IL-17) [346].

DOI 10.1002/art.37865

**Functionally relevant Treg cells are present in giant cell arteritis lesions: comment on the article by Samson et al**

*To the Editor:*

We read with great interest the recently published article by Samson et al (1) on the distribution of circulating CD4<sup>+</sup> T lymphocyte subsets (Th1, Th17, CD161<sup>+</sup> cells, which are common precursors of Th1, Th17, and Treg cells) in a cohort of 34 patients with active giant cell arteritis (GCA) or polymyalgia rheumatica and 31 healthy controls. Among other interesting and relevant findings, the authors observed an increase in circulating Th17 cells and common Th1/Th17 (CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>) precursors, and a decrease in the number, but not function, of Treg cells in peripheral blood. The authors also investigated the presence of lymphocyte subsets in temporal artery lesions from 7 patients and concluded that there were no Treg cells (identified as FoxP3<sup>+</sup> cells) in the inflammatory infiltrates of patients with GCA.

In a recent study, we found that FoxP3<sup>+</sup> cells, although not predominant, are indeed present in GCA lesions (2). Using quantitative real-time reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR), we also found significantly increased expression of FoxP3 messenger RNA (mRNA) in the temporal arteries of 38 untreated GCA patients compared to 19 controls, and demonstrated that expression of FoxP3 mRNA was significantly reduced in 19 specimens from glucocorticoid-treated patients with GCA (2). This accords with a previous study demonstrating the presence of a nonpredominant subset of CD25<sup>+</sup> cells in GCA lesions and the decrease in the number of those cells after glucocorticoid treatment (3). Moreover, Treg cells present in GCA lesions are functionally relevant; they may express interleukin-17 (IL-17) in patients with active disease, as demonstrated by immunofluorescence and confocal microscopy, and IL-17 expression by FoxP3<sup>+</sup> cells decreases with treatment (2). These observations highlight the functional plasticity of CD4<sup>+</sup> T cells depending on inflammatory stimuli and cytokine predominance in the micro-environment (4,5), as well as the relevance of cells expressing FoxP3 in GCA.

The apparently opposite results described by Samson et al (1) may be due to technical issues. Transcription factors such as FoxP3 are usually expressed at low levels, and immunohistochemistry may not be sensitive enough to detect them in a nonpredominant cell subset. More sensitive techniques, such as real-time RT-PCR or immunofluorescence with confocal microscopy, may be needed to detect FoxP3-expressing cells in GCA-affected arteries. Furthermore, more samples need to be examined, given the wide variability in the density of inflammatory infiltrates in GCA.

A recent study showed that treatment with low-dose IL-2, which results in an increase in the number of Treg cells, reduces vascular inflammation in cryoglobulinemic vasculitis (5), suggesting that Treg cells may be a target for therapeutic manipulation in inflammatory diseases of blood vessels. Therefore, caution is needed before concluding that a potentially important functional T cell subset or biomarker is absent when using techniques with limited sensitivity and/or studying a small number of samples.

Supported by grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (SAF 08/04328 and SAF 11/30073).

Marc Corbera-Bellalta, PhD  
Ester Planas-Rigol, PhD  
Georgina Espígol-Frigolé, MD  
Ester Lozano, PhD  
Maria C. Cid, MD  
*Hospital Clinic University of Barcelona  
and Institut d'Investigacions Biomèdiques  
August Pi i Sunyer  
Barcelona, Spain*

1. Samson M, Audia S, Fraszczak J, Trad M, Ornetti P, Lakomy D, et al. Th1 and Th17 lymphocytes expressing CD161 are implicated in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica pathogenesis. *Arthritis Rheum* 2012;64:3788–98.
2. Espígol-Frigole G, Corbera-Bellalta M, Planas-Rigol E, Lozano E, Segarra M, García-Martínez A, et al. Increased IL-17A expression in temporal artery lesions is a predictor of sustained response to glucocorticoid treatment in patients with giant-cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2013. E-pub ahead of print.
3. Cid MC, Campo E, Ercilla G, Palacin A, Vilaseca J, Villalta J, et al. Immunohistochemical analysis of lymphoid and macrophage cell subsets and their immunologic activation markers in temporal arteritis: influence of corticosteroid treatment. *Arthritis Rheum* 1989;32:884–93.
4. O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 2010;327:1098–102.
5. Saadoun D, Rosenzweig M, Joly F, Six A, Carrat F, Thibault V, et al. Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N Engl J Med* 2011;365:2067–77.

DOI 10.1002/art.37863

## Reply

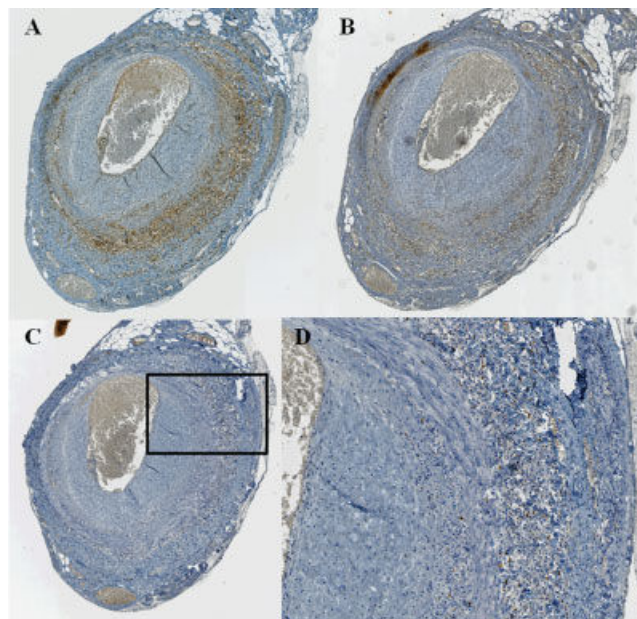
To the Editor:

We thank Dr. Corbera-Bellalta and colleagues for their interesting comments regarding our work on the implication of Th1, Th17, and Treg cells in GCA and polymyalgia rheumatica (PMR). In our study, we assessed Treg cells in peripheral blood and in temporal artery biopsy samples. We demonstrated that circulating Treg cells were functionally not

altered but that percentages of the cells were decreased in the blood of patients with GCA and patients with PMR in comparison with healthy controls. In temporal artery biopsy samples from GCA patients, Th1 cells and Th17 cells, identified by interferon- $\gamma$  and IL-17 staining, respectively, massively infiltrated the entire arterial wall (Figures 1A and B), whereas FoxP3+ cells were detected at a very low level, especially at the adventitia-media junction, where the inflammatory infiltrate was the most prominent (Figures 1C and D).

We do agree with Corbera-Bellalta et al that immunohistochemistry is not the most sensitive technique to detect FoxP3+ T cells. However, in our study, the same technique was used for detection of Treg cells, Th1 cells, and Th17 cells. Even if the number of FoxP3+ cells infiltrating the temporal artery may have been underestimated in our study, there is no doubt that there is a strong imbalance between Th1, Th17, and Treg cells. Furthermore, we demonstrated that a 1:2 ratio of Treg cells to effector T cells was required in vitro to observe efficient suppressive activity. Consequently, even if it is true that we did not detect all FoxP3+ cells because of a lack of sensitivity, these results suggest that their number was not sufficient to suppress Th1 and Th17 immune responses in the artery.

In a recent study, Corbera-Bellalta and colleagues interestingly detected FoxP3+IL-17+ T cells in the arterial wall of GCA patients, demonstrating the functional plasticity of T cells regulated by cytokines produced in their microenvironment (1). However, human CD4+ T cells expressing FoxP3+ cannot be systematically considered to be suppressive cells. FoxP3 can indeed be induced in naive CD4+ T cells activated in vitro (2). FoxP3+CD4+ T cell subsets are delineated depending on the



**Figure 1.** Analysis of one representative temporal artery biopsy sample from a patient with giant cell arteritis. **A**, Staining with anti-interferon- $\gamma$ . **B**, Staining with anti-interleukin-17. **C** and **D**, Staining with anti-FoxP3. Boxed area in **C** is shown at higher magnification in **D**. Original magnification  $\times 40$  in **A–C**;  $\times 120$  in **D**.

level of FoxP3 and CD45RA expression: FoxP3<sup>low</sup>CD45RA<sup>+</sup> and FoxP3<sup>high</sup>CD45RA<sup>−</sup> T cells are immunosuppressive cells, but FoxP3<sup>low</sup>CD45RA<sup>−</sup> T cells are cytokine-secreting nonsuppressive T lymphocytes, and ~16% of them also produce IL-17 (3). This may suggest that the FoxP3+IL-17+ T cells detected by confocal microscopy in GCA temporal artery biopsy samples (1) are not suppressive Treg cells, but rather, that they are IL-17-producing T cells that coexpress FoxP3 (1,4).

*Dr. Bonnotte has received consulting fees, speaking fees, and/or honoraria from GlaxoSmithKline, LFB, and Amgen (less than \$10,000 each).*

Maxime Samson, MD  
*University of Burgundy  
 and University Hospital of Dijon  
 Dijon, France  
 and INSERM UMR1098  
 Besançon, France*  
 Nona Janikashvili, PhD  
*University of Burgundy  
 Dijon, France  
 and INSERM, UMR1098  
 Besançon, France*  
 Laurent Martin, MD  
 Sylvain Audia, MD, PhD  
 Bernard Bonnotte, MD, PhD  
*University of Burgundy  
 and University Hospital of Dijon  
 Dijon, France  
 and INSERM UMR1098  
 Besançon, France*

1. Espigol-Frigole G, Corbera-Bellalta M, Planas-Rigol E, Lozano E, Segarra M, Garcia-Martinez A, et al. Increased IL-17A expression in temporal artery lesions is a predictor of sustained response to glucocorticoid treatment in patients with giant-cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2013. E-pub ahead of print.
2. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol* 2007;37:129–38.
3. Unizony S, Arias-Urdaneta L, Miloslavsky E, Arvikar S, Khosroshahi A, Keroack B, et al. Tocilizumab for the treatment of large-vessel vasculitis (giant cell arteritis, Takayasu arteritis) and polymyalgia rheumatica. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012;64:1720–9.
4. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup> T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009;30:899–911.

**5. Article 4: “Are IL-10<sup>+</sup> regulatory Th17 cells implicated in the sustained response to glucocorticoid treatment in patients with giant cell arteritis? Comment on the paper of Espigol-Frigole *et al*”**

Dans l'étude d'Espigol-Frigole *et al.* [370], les auteurs ont confirmé que les lymphocytes Th17 infiltraient massivement la paroi des artères de patients atteints d'ACG. Cependant, plus le niveau d'expression d'IL-17 mesuré par PCR dans la paroi artérielle était élevé, moins les patients présentaient de rechute et plus la corticothérapie était de courte durée. Les auteurs n'ont pas retrouvé de corrélation entre le niveau d'expression de l'IL-17 et de ROR $\gamma$  ou ROR $\alpha$ . Ainsi, ils ont émis l'hypothèse que les lymphocytes Th17 n'étaient pas la seule source d'IL-17 dans les lésions d'ACG.

Comme nous l'avons vu ci-dessus, ils ont aussi mis en évidence par microscopie confocale des LT FoxP3<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> dans la paroi artérielle des patients atteints d'ACG au diagnostic. Ces cellules disparaissaient après traitement par corticoïdes. Les auteurs pensent que ces LT FoxP3<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> sont des Treg induits qui facilitent la rémission de la maladie lorsque la corticothérapie est débutée, expliquant pourquoi le pronostic de l'ACG est meilleur chez les malades ayant une forte production d'IL-17 au diagnostic.

Cependant, et comme nous venons de l'aborder pour l'article 3, l'expression de FoxP3 ne suffit pas à définir les Treg. La réponse immunitaire T n'est pas un processus figé mais dynamique puisqu'en fonction de leur environnement cytokinique, des lymphocytes Treg peuvent se différencier en Th1 ou Th17 et inversement. Ce processus est appelé plasticité [203,229,364]. En accord avec ce concept, ont été décrits des lymphocytes Th17 exprimant FoxP3, produisant de l'IL-17 et de l'IL-10 mais pas d'IFN- $\gamma$  et ayant une fonction immunosuppressive [371,372].

Afin de mieux comprendre la valeur pronostique de la forte expression de l'IL-17 dans les lésions d'ACG, nous avons émis l'hypothèse que certains de ces

lymphocytes Th17 pouvaient acquérir ce phénotype régulateur. Nous avons donc mesuré, chez 19 patients affectés d'ACG et 28 sujets contrôles, la concentration sérique en IL-10.

La concentration d'IL-10 était augmentée dans le sérum des patients atteints d'ACG comparativement à des sujets contrôles. De plus, la concentration d'IL-10 au diagnostic était significativement plus basse chez les 4 patients qui ont rechuté au cours du suivi.

Ces résultats nous font émettre l'hypothèse que les LT FoxP3<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> observés par Espigol-Frigole *et al.* [370] dans les lésions d'ACG pourraient aussi produire de l'IL-10 et correspondre à des lymphocytes Th17 régulateurs [371,372]. Plus que la production d'IL-17, c'est peut-être celle d'IL-10 par ces lymphocytes Th17 régulateurs qui serait responsable d'une meilleure réponse thérapeutique chez certains patients.



## LETTER

## Are IL-10+ regulatory Th17 cells implicated in the sustained response to glucocorticoid treatment in patients with giant cell arteritis? Comment on the paper of Espigol-Frigole *et al*

We have read with interest the recently published paper of Espigol-Frigole *et al*<sup>1</sup> in which the authors confirmed that interleukin (IL)-17 is highly expressed in giant cell arteritis (GCA) lesions.<sup>1-3</sup> They also demonstrated for the first time that IL-17 expression in temporal artery biopsies (TABs) was correlated with a better outcome. Among other interesting results, the identification of Foxp3+IL-17+ T cells by confocal microscopy in TAB made the authors to hypothesize that these cells could be induced regulatory T cells (Treg) that may facilitate the remission of the disease under steroid therapy.

Evidence has been recently published regarding the plasticity of the different T helper subsets, such as Th1, Th17 and Treg cells, that can differentiate into each other, depending on the cytokines produced in their microenvironment.<sup>4-6</sup> Actually, Th17 cells with an anti-inflammatory phenotype have been described. This subset of Th17 cells expresses Foxp3 and produces IL-17, IL-10 but not interferon- $\gamma$  and exerts regulatory functions.<sup>7,8</sup> Their genesis is induced by the combination of IL-6 and transforming growth factor- $\beta$ .<sup>8</sup> We have recently assessed TAB of GCA patients, showing also that Th17 cells highly infiltrated GCA lesions with only very few Treg.<sup>3</sup> We have also confirmed that the percentage of circulating Th17 cells was increased in GCA. In

accordance with Espigol-Frigole, we hypothesized that a part of these Th17 cells could have been differentiated into regulatory cells secreting suppressive cytokines. Thus, we investigated the level of IL-10 in the serum of 19 patients affected by GCA and 28 healthy controls. IL-10 was measured by Luminex technology as described earlier.<sup>3</sup> Interestingly, the level of IL-10 was increased in the serum of patients affected by GCA, in comparison with healthy controls: mean $\pm$ SEM was 2.6 $\pm$ 0.74 vs 0.91 $\pm$ 0.33. Moreover, the level of IL-10, probably secreted by regulatory Th17 cells, was predictive of the outcome of the GCA patients. After a mean follow-up of 23.7 $\pm$ 1.4 months, 4 patients experienced a relapse, 2 patients were corticosteroid dependent and the remission was sustained without relapse in 13 patients. Interestingly, IL-10 was significantly lower at the time of diagnosis in patients who experienced a relapse in comparison with patients without relapse (0.72 $\pm$ 0.16 vs 2.36 $\pm$ 0.56 pg/ml;  $p=0.0233$ ).

Taken together, these results could explain the better outcome of patients expressing high levels of IL-17 in TAB. Espigol-Frigole *et al* have indeed demonstrated that Foxp3+ T cells contributed to the production of IL-17 in these patients. We hypothesize that these cells also produce IL-10 and match to a subset of anti-inflammatory Th17 cells characterised by an IL-10+Foxp3+IL-17+ phenotype. The better outcome of patients expressing high levels of IL-17 in GCA lesions could be linked to the amount of regulatory IL-10+Foxp3+IL-17+ T cells in GCA lesions rather than the level of conventional proinflammatory Th17 cells.

Maxime Samson,<sup>1,2,3</sup> Sylvain Audia,<sup>1,2,3</sup>  
Nona Janikashvili,<sup>2,3</sup> Bernard Bonnotte<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Service de Medecine Interne et Immunologie Clinique, Centre Hospitalier Universitaire de Dijon, Dijon, France

<sup>2</sup>INSERM, UMR1098, Besancon Cedex, France

<sup>3</sup>Faculte de Medecine, Universite de Bourgogne, IFR100, Dijon, France

**Correspondence to** Dr Maxime Samson, Service de Medecine Interne et Immunologie Clinique, CHU de Dijon, 2 Bd Mal de Lattre de Tassigny, 21000 Dijon, France; Faculty of Medicine, INSERM UMR1098, University of Burgundy, 21000 Dijon, France; [samsonmaxime@gmail.com](mailto:samsonmaxime@gmail.com)

**Competing interests** None.

**Provenance and peer review** Not commissioned; internally peer reviewed.

**To cite** Samson M, Audia S, Janikashvili N, *et al*. *Ann Rheum Dis* Published Online First: [please include Day Month Year] doi:10.1136/annrheumdis-2013-203439

Accepted 10 February 2013

*Ann Rheum Dis* 2013;**00**:1.

doi:10.1136/annrheumdis-2013-203439

## REFERENCES

- 1 Espigol-Frigole G, Corbera-Bellalta M, Planas-Rigol E, *et al*. Increased IL-17A expression in temporal artery lesions is a predictor of sustained response to glucocorticoid treatment in patients with giant-cell arteritis. *Ann Rheum Dis* Published Online First 19 Sep 2012. doi:10.1136/annrheumdis-2012-201836.
- 2 Deng J, Younge BR, Olshen RA, *et al*. Th17 and Th1 T-cell responses in giant cell arteritis. *Circulation* 2010;121:906-15.
- 3 Samson M, Audia S, Fraszczak J, *et al*. Th1 and Th17 lymphocytes expressing CD161 are implicated in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica pathogenesis. *Arthritis Rheum* 2012;64:3788-98.
- 4 Annunziato F, Romagnani S. Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Res Ther* 2009;11:257.
- 5 Peck A, Mellins ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology* 2010;129:147-53.
- 6 Zhu J, Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* 2010;20:4-12.
- 7 Lochner M, Peduto L, Cherrier M, *et al*. In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgamma t+ T cells. *J Exp Med* 2008;205:1381-93.
- 8 McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, *et al*. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 2007;8:1390-7.

## **6. Article 5: “Is TNF- $\alpha$ really involved in giant cell arteritis pathogenesis?”**

Comme nous l'avons évoqué en première partie de cette thèse, les corticoïdes sont la pierre angulaire du traitement de l'ACG. Bien que remarquablement efficaces, les corticoïdes sont responsables d'une morbi-mortalité non négligeable dans cette population âgée [97]. C'est la raison pour laquelle divers traitements d'épargne cortisonée ont été testés au cours de l'ACG. Parmi eux, les anti-TNF- $\alpha$  n'ont pas démontré d'efficacité dans cette indication [100,104-106].

Finalement, en dehors du fait que les macrophages et les cellules géantes présents dans les lésions d'ACG produisent du TNF- $\alpha$  [373], aucune donnée n'est en faveur d'un rôle du TNF- $\alpha$  dans la pathogénie de l'ACG. Les premières étapes de la physiopathologie de l'ACG correspondent à l'activation des DC de l'adventice qui conduit au recrutement et à l'activation des LT CD4. C'est ensuite les cytokines produites par ces LT qui activent les macrophages et conduisent aux lésions caractéristiques de l'ACG.

Dans cette étude, nous avons mesuré la concentration sérique en TNF- $\alpha$ , ainsi que la production de TNF- $\alpha$  par les LT CD4<sup>+</sup>, les Th17 et les LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> chez 21 patients avec une ACG non traitée, 20 patients avec une ACG traitée par corticoïdes depuis 3 mois et 31 témoins appariés pour l'âge et le sexe.

A l'inverse de l'IL-6 qui était élevée dans le sérum des patients avant traitement, la concentration de TNF- $\alpha$  n'était pas différente entre les patients (traités ou non) et les témoins. De même, aucune différence n'a été observée entre ces 3 groupes concernant la production de TNF- $\alpha$  par les LT CD4<sup>+</sup>, les Th17 ou les LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>.

Ces données vont contre une implication majeure du TNF- $\alpha$  dans la physiopathologie de l'ACG et expliquent probablement l'absence d'efficacité des anti-TNF- $\alpha$  dans le traitement de l'ACG [100,104-106]. A l'inverse, et comme suggéré par plusieurs travaux fondamentaux ou cliniques [116,118-131], l'IL-6 semble une cible thérapeutique prometteuse au cours de l'ACG.

## Is TNF- $\alpha$ really involved in giant cell arteritis pathogenesis?

Giant cell arteritis (GCA) is the most frequent vasculitis in people >50 years, and glucocorticoids (GC) remain the cornerstone of the treatment. However, this long-term treatment is responsible for numerous GC-related complications.<sup>1</sup> Thus, reliable GC-sparing drugs need to be explored. Seror *et al*<sup>2</sup> have

recently reported the inefficacy of adalimumab, a humanised anti-TNF- $\alpha$  therapy, as a GC-sparing drug in the treatment of GCA. These clinical results contrast with previous studies reporting a production of TNF- $\alpha$  by giant cells and macrophages in GCA lesions.<sup>3</sup> However, recent advance in the knowledge of GCA pathogenesis have shown that macrophages and giant cells are not involved in the first steps of GCA pathogenesis as they are recruited following CD4 T cells infiltration.<sup>4 5</sup> We recently demonstrated that CD4CD161<sup>+</sup> T lymphocytes

**Table 1** Clinical and biological characteristics of GCA patients and healthy controls

	Untreated GCA (n=21)	Treated GCA (n=20)	Healthy controls (n=31)	p Value*
Age, mean $\pm$ SEM	74.71 $\pm$ 2.42	74.16 $\pm$ 2.45	73.86 $\pm$ 1.63	0.9012
Symptoms, n (%)				
Headache	15 (71)	0 (0)	—	—
Scalp tenderness	9 (43)	0 (0)	—	—
Jaw claudication	12 (57)	0 (0)	—	—
Any abnormal temporal artery	14 (67)	0 (0)	—	—
Visual sign	8 (38)	0 (0)	—	—
Polymyalgia rheumatica	8 (38)	0 (0)	—	—
Biology, mean $\pm$ SEM				
Erythrocyte sedimentation rate (1st hour) (mm)†	60.85 $\pm$ 4.41	14.42 $\pm$ 2.71	18.1 $\pm$ 2.82	<0.0001
C reactive protein (mg/L)	92.34 $\pm$ 12.52	5.30 $\pm$ 0.80	3.46 $\pm$ 0.22	<0.0001
Lymphocyte count (/mm <sup>3</sup> )	1466 $\pm$ 172	2244 $\pm$ 305	1838 $\pm$ 131	0.037
CD4 T cells (% in total lymphocytes)	54.38 $\pm$ 2.48	52.65 $\pm$ 3.46	49.57 $\pm$ 1.43	0.06
IL-6 level in the serum (pg/mL)‡	65.61 $\pm$ 8.19	11.46 $\pm$ 4.29	4.01 $\pm$ 0.62	<0.0001

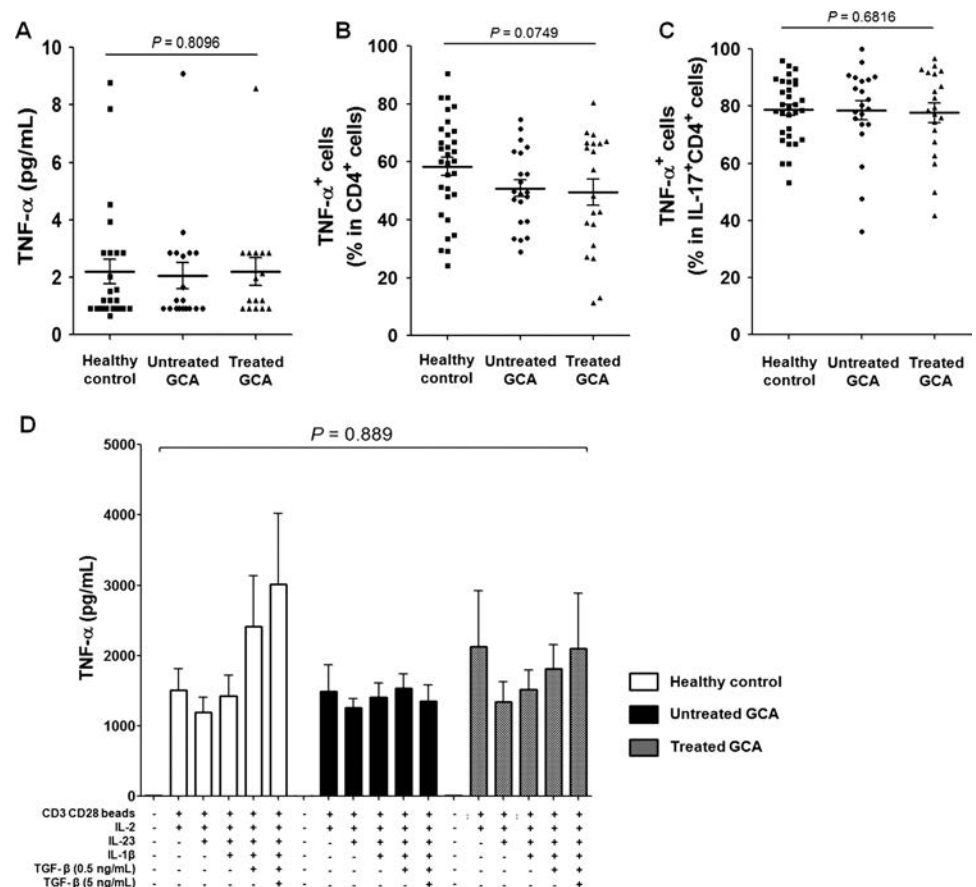
\*p was calculated using the Kruskal–Wallis test.

†Available for 20 untreated GCA, 19 treated GCA and 29 healthy controls.

‡Available for 19 untreated GCA, 16 treated GCA and 25 healthy controls; quantified by Luminex technology.

GCA, giant cell arteritis.

**Figure 1** (A) TNF- $\alpha$  dosage in the serum of 19 untreated giant cell arteritis (GCA) patients, 16 treated GCA patients and 25 healthy controls. (B, C) Flow cytometry analysis of CD4 T cells in 21 untreated GCA, 20 treated GCA and 31 healthy controls. (D) Study of circulating CD4CD161<sup>+</sup> T cells isolated from untreated patients (n=7), treated patients (n=8) and controls (n=12) cultured with or without anti CD3 and CD28 microbeads, IL-23 (50 ng/mL), IL-1 $\beta$  (50 ng/mL), IL-2 (25 U/mL), TGF- $\beta$  (0.5 or 5 ng/mL). The supernatant was collected after 72 h of culture. TNF- $\alpha$  was quantified by luminex technology. p Value was calculated using the Kruskal–Wallis test. Histograms represent means and error bars the SE of the mean.



largely infiltrate GCA lesions generating Th1 and Th17 cells, and play a major role in GCA pathogenesis.<sup>4–6</sup> Thus, we investigated the serum level of TNF- $\alpha$  and the production of TNF- $\alpha$  by these key cells isolated from GCA patients with active disease (n=21), or in remission after 3 months of GC therapy (n=20), and age-matched healthy controls (n=31) (table 1). As previously described,<sup>6</sup> functional assays were performed for measuring the TNF- $\alpha$  secretion by isolated CD4CD161<sup>+</sup> T cells activated with anti-CD3/CD28 microbeads and cultured with the addition of different cytokines, such as IL-23, IL-1 $\beta$ , IL-2 and TGF- $\beta$ , as indicated in figure 1. The percentages of CD4 T cells stained with anti-TNF- $\alpha$  and anti-IL-17 antibodies were also studied in the three groups, as described earlier.<sup>6</sup>

No difference was found regarding the serum level of TNF- $\alpha$  between untreated GCA patients ( $2.06 \pm 0.45$  pg/mL), treated GCA patients ( $2.20 \pm 0.48$  pg/mL) and healthy controls ( $2.20 \pm 0.43$  pg/mL) ( $p=0.8096$ ; figure 1A), whereas IL-6 was significantly increased in the serum of untreated GCA patients when compared with treated patients and controls (table 1). The percentages of TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> cells in total CD4 T cells and in Th17 cell subset did not differ significantly between the three groups (figure 1B,C). Interestingly, despite CD4CD161<sup>+</sup> T cells produced some amount of TNF- $\alpha$ , no difference was noticed between the three groups, whatever the conditions of culture (figure 1D).

Our data argue against a major implication of TNF- $\alpha$  in GCA pathogenesis and could explain the results of Seror *et al*<sup>2</sup> that concluded, as others,<sup>7,8</sup> to the inefficacy of anti-TNF- $\alpha$  drugs in the treatment of GCA. Even though the production of TNF- $\alpha$  has been demonstrated in giant cells and macrophages in GCA lesions,<sup>3</sup> it is probably not a key process in GCA pathogenesis, as macrophage recruitment is one of the last steps of GCA onset.<sup>4,5</sup> Recent data have brought evidence for a major implication of Th1, Th17 and Treg cells and the production of IL-6 in the pathogenesis of GCA.<sup>4–6</sup> It should prompt clinicians to use therapy blocking the IL-6 pathway and/or targeting cytokines involved in the control of the Th17/Treg balance, the former being corrected by tocilizumab,<sup>9</sup> a humanised anti-IL-6 receptor antibody that seems to be the most promising approach for the treatment of GCA.<sup>10</sup>

**Maxime Samson,<sup>1,2,3</sup> Sylvain Audia,<sup>1,2,3</sup> Nona Janikashvili,<sup>1,2,3</sup> Bernard Bonnotte<sup>1,2,3</sup>**

<sup>1</sup>Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, CHU de Dijon, 2 Bd Mal de Lattre de Tassigny, Dijon, France

<sup>2</sup>INSERM, UMR1098, Besançon, Cedex, France

<sup>3</sup>Université de Bourgogne, Faculté de Médecine, Dijon, France

**Correspondence to** Professor Bernard Bonnotte, Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, CHU Dijon le Bocage, 2 Bd Mal de Lattre de Tassigny, Dijon 21000, France; [Bernard.bonnotte@chu-dijon.fr](mailto:Bernard.bonnotte@chu-dijon.fr)

**Acknowledgements** Flow cytometry experiments were performed and analysed in Plateforme de Cytométrie, Institut Fédératif de Recherche 100, Université de Bourgogne. We thank Malika Trad, Marion Ciudad, Alexandrine Gautheron, Famky Seaphanh and Daniela Lakomy for their help in performing experiments.

**Collaborators** Malika Trad; Marion Ciudad; Alexandrine Gautheron; Famky Seaphanh; Daniela Lakomy.

**Contributors** Conception, analysis and interpretation of data: MS, SA, NJ, BB. Drafting the article: MS, SA, NJ, BB. Final approval: MS, SA, NJ, BB.

**Funding** This work was supported by grants from the University Hospital of Dijon, the Direction de la Recherche Clinique and the Conseil Régional de Bourgogne 2010.

**Competing interests** None.

**Ethics approval** The study (2009-A00534-53) was approved by the Institutional Review Board and the Ethic Committee of the university hospital of Dijon.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

**To cite** Samson M, Audia S, Janikashvili N, *et al.* *Ann Rheum Dis* Published Online First: [please include Day Month Year] doi:10.1136/annrheumdis-2013-204462

Received 16 August 2013

Accepted 18 August 2013

*Ann Rheum Dis* 2013;0:1–2. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204462

## REFERENCES

- 1 Proven A, Gabriel SE, Orces C, *et al.* Glucocorticoid therapy in giant cell arteritis: duration and adverse outcomes. *Arthritis Rheum* 2003;49:703–8.
- 2 Seror R, Baron G, Hachulla E, *et al.* Adalimumab for steroid sparing in patients with giant-cell arteritis: results of a multicentre randomised controlled trial. *Ann Rheum Dis* Published Online First: 29 July 2013. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203586
- 3 Field M, Cook A, Gallagher G. Immuno-localisation of tumour necrosis factor and its receptors in temporal arteritis. *Rheumatol Int* 1997;17:113–18.
- 4 Samson M, Audia S, Martin L, *et al.* Pathogenesis of giant cell arteritis: new insight into the implication of CD161<sup>+</sup> T cells. *Clin Exp Rheumatol* 2013;31:S65–73.
- 5 Weyand CM, Goronzy JJ. Medium- and large-vessel vasculitis. *N Engl J Med* 2003;349:160–9.
- 6 Samson M, Audia S, Fraszczak J, *et al.* Th1 and Th17 lymphocytes expressing CD161 are implicated in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica pathogenesis. *Arthritis Rheum* 2012;64:3788–98.
- 7 Hoffman GS, Cid MC, Rendt-Zagar KE, *et al.* Infliximab for maintenance of glucocorticosteroid-induced remission of giant cell arteritis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007;146:621–30.
- 8 Martinez-Taboada VM, Rodriguez-Valverde V, Carreno L, *et al.* A double-blind placebo controlled trial of etanercept in patients with giant cell arteritis and corticosteroid side effects. *Ann Rheum Dis* 2008;67:625–30.
- 9 Samson M, Audia S, Janikashvili N, *et al.* Brief report: inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg cell imbalance in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2012;64:2499–503.
- 10 Salvarani C, Magnani L, Catano M, *et al.* Tocilizumab: a novel therapy for patients with large-vessel vasculitis. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51:151–6.

## LA BALANCE TH17/TREG ET LE ROLE DE L'IL-6

---

### 1. Article 6 : “Inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg imbalance in patients with rheumatoid arthritis”

#### *Déséquilibre de la balance Th17/Treg dans la polyarthrite rhumatoïde*

Comme nous l'avons abordé, les LT CD4 peuvent se polariser en différentes sous-populations qui coordonnent différents types de réponses immunitaires. Parmi eux, certains ont un rôle pro-inflammatoire comme les lymphocytes Th17 et d'autres ont un rôle anti-inflammatoire comme les Treg. Un excès de réponse Th17 et/ou un défaut de réponse Treg aboutissant à un déséquilibre de la balance Th17/Treg est impliqué dans plusieurs maladies auto-immunes dont la PR [374]. Au cours de l'ACG, nous avons montré qu'il existait à la fois un excès de lymphocytes Th17 et un défaut de Treg, provoquant ainsi un déséquilibre de la balance Th17/Treg. Ce déséquilibre n'est que partiellement corrigé par la corticothérapie puisqu'elle permet de diminuer le pourcentage de lymphocytes Th17 circulants mais ne corrige pas le déficit quantitatif en Treg circulants [83].

La PR est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques. Comme toute maladie auto-immune (MAI), c'est une affection multifactorielle relevant de facteurs psychologiques, endocriniens, génétiques, environnementaux et immunologiques [375]. Elle affecte principalement les femmes, surtout entre 40 et 60 ans. L'incidence française varie selon les critères diagnostiques retenus mais se situe entre 7,6 et 8,8 cas pour 100 000 habitants par an [376,377].

Dans les modèles expérimentaux de PR, comme celui de l'arthrite au collagène, l'IFN- $\gamma$  était jusqu'à récemment considéré comme responsable de l'activation de la réponse immunitaire contre les articulations [240,241] même si certains travaux contradictoires attribuaient à l'IFN- $\gamma$  un effet protecteur [242,243]. Comme nous l'avons déjà évoqué, il existait en fait une confusion entre l'IL-12 et l'IL-23 car ces 2 cytokines partagent une sous-unité commune (p40) [244]. Or, c'est cette sous-unité commune qui était mesurée dans les dosages supposés mettre en

évidence une élévation de l'IL-12. Les études ultérieures ont alors montré le rôle pathogène de l'IL-23 (voie Th17) dans l'arthrite au collagène, alors que l'IL-12 (voie Th1) a un effet protecteur [238,245].

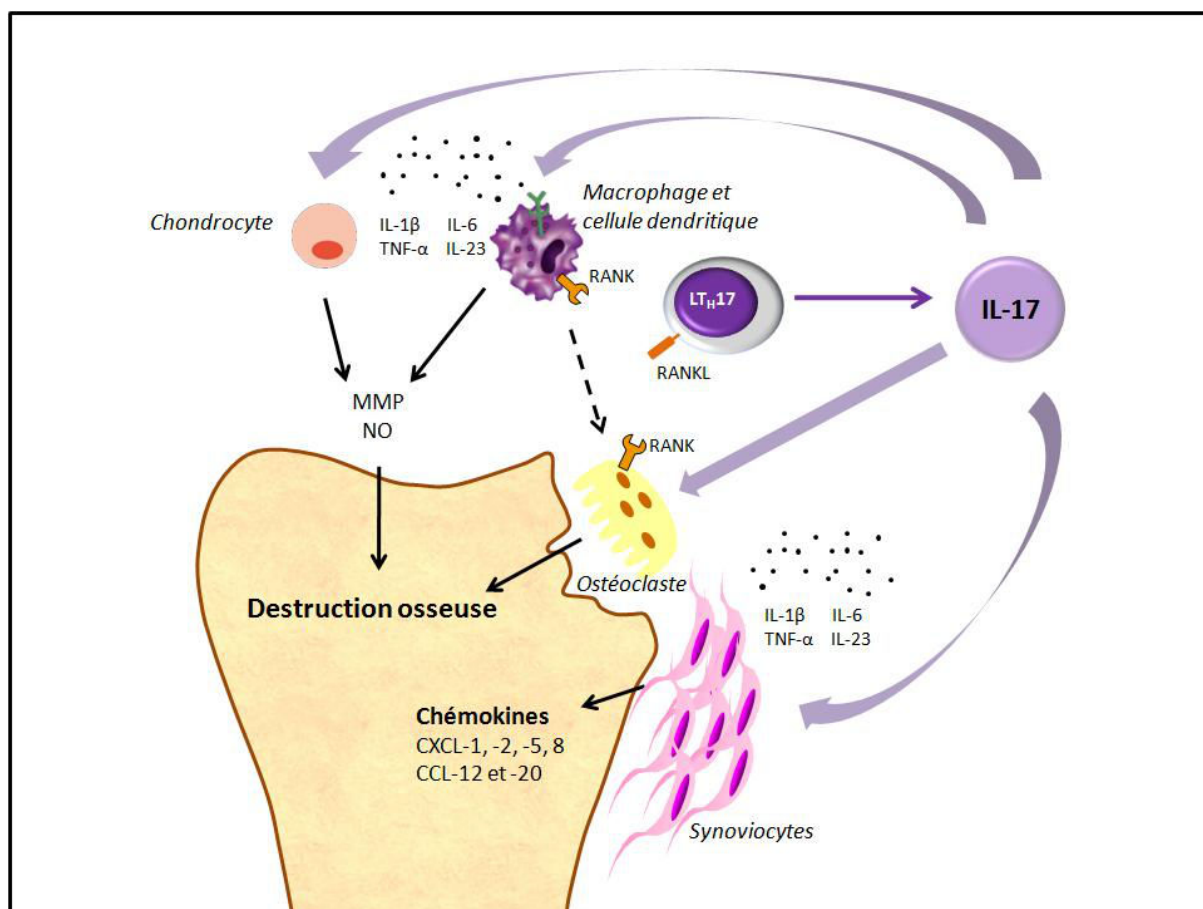
L'importance de l'IL-17 dans le développement des arthrites a été confirmée dans des modèles animaux : les souris dont le gène de l'IL-17 a été invalidé développent moins d'arthrites que les souris sauvages, et un traitement par anticorps neutralisant l'IL-17 ou par récepteurs solubles de l'IL-17 diminue l'intensité de l'atteinte articulaire [378-380].

L'équipe de Pierre Miossec a été la première à montrer que l'IL-17 était significativement augmentée dans le sérum et le liquide synovial de malades atteints de PR comparativement à des patients souffrant d'arthrose [234]. Dans une étude prospective chez 60 patients atteints de PR, menée sur une période de 2 ans, il a été rapporté qu'une forte expression des ARNm de l'IL-17, du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  était prédictive d'une progression plus rapide des lésions articulaires évaluées par IRM [381]. Il a été montré *in vitro* que l'IL-17 activait les monocytes, les chondrocytes, les macrophages, les fibroblastes et les ostéoblastes, entraînant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-23. L'IL-6 et l'IL-23 favorisent le développement des lymphocytes Th17 et créent une boucle d'amplification qui conduit à l'activation perpétuelle des LT, phénomène probablement capital dans la genèse de la réaction auto-immune [382]. L'IL-17 entraîne aussi la sécrétion de chémokines par les cellules de la synoviale telles que CXCL1, -2, -5, -8 et CCL12 et -20 qui permettent le recrutement de LT, LB, monocytes et PNN au niveau de la membrane synoviale [382,383].

Les lymphocytes Th17 jouent aussi un rôle direct dans la destruction articulaire. En effet, l'IL-17 favorise la sécrétion par les chondrocytes, les cellules dendritiques et les macrophages de métalloprotéases et de monoxyde d'azote, responsables de la destruction cartilagineuse. De plus, l'IL-17 augmente l'expression de la molécule RANK à la surface des précurseurs des ostéoclastes. Or, les lymphocytes Th17 expriment à leur surface RANK ligand (RANKL) et sont donc capables d'activer directement les ostéoclastes responsables de la résorption osseuse via le système RANK/RANKL [255,382,384].



Les lymphocytes Th17 sont donc impliqués de façon majeure dans la physiopathologie de la PR. Leur rôle est résumé dans la figure 9.



**Figure 9 : Rôle des lymphocytes Th17 dans la physiopathologie de la PR**

L'IL-17 produite par les lymphocytes Th17 est augmentée dans le sérum et le liquide synovial de malades atteints de PR. Elle active les monocytes, les chondrocytes, les macrophages, les fibroblastes et les ostéoblastes, entraînant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β, le TNF-α, l'IL-6 et l'IL-23. L'IL-6 et l'IL-23 favorisent le développement des lymphocytes Th17 et créent une boucle d'amplification qui conduit à l'activation perpétuelle des LT, phénomène probablement capital dans la genèse de la réaction auto-immune. L'IL-17 entraîne aussi la sécrétion par les cellules de la synoviale de chémokines telles que CXCL1, -2, -5, -8 et CCL12 et -20 qui permettent le recrutement de LT, LB, monocytes et PNN au niveau de la membrane synoviale, favorisant l'emballement de la réponse inflammatoire au niveau de l'articulation. L'IL-17 favorise aussi la sécrétion par les chondrocytes, les cellules dendritiques et les macrophages de métalloprotéases et de monoxyde d'azote, responsables de la destruction cartilagineuse. De plus, l'IL-17 augmente l'expression de la molécule RANK à la surface des précurseurs des ostéoclastes. Les lymphocytes Th17 exprimant à leur surface RANK ligand (RANKL) sont donc capables d'activer directement les ostéoclastes responsables de la résorption osseuse.

Les lymphocytes Treg, par l'intermédiaire d'un défaut quantitatif et/ou qualitatif, sont également impliqués dans la physiopathologie de la PR [385,386].

Dans le modèle de l'arthrite au collagène, une déplétion en Treg par un anticorps anti-CD25 aggrave les lésions d'arthrites [387] alors que le transfert adoptif de LT CD25<sup>+</sup> en diminue la sévérité [388]. Chez les souris K/BxN *scurfy*, déficitaires en Treg, l'arthrite au collagène est significativement plus précoce et plus sévère que chez les souris normales [389]. Ainsi, à l'inverse des Th17, les Treg jouent un rôle protecteur dans l'arthrite à collagène, qui est le modèle murin le plus utilisé pour étudier la PR.

Chez les patients atteints de PR, le nombre de Treg présents dans le liquide synovial est augmenté par rapport au sang périphérique, et ces Treg expriment plus CTLA-4, GITR, OX-40 et FoxP3 [390]. Dans le sang périphérique, les données sont contradictoires, notamment parce que le phénotype retenu pour identifier les Treg n'est pas homogène d'une étude à l'autre : diminution du nombre de Treg circulants par rapport à des sujets sains dans certaines études [391-393], absence de modification [362,390,394,395] ou même augmentation du nombre de Treg circulants dans d'autres études [396,397]. Sur le plan fonctionnel, les Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) circulants de patients atteints de PR sont capables d'inhiber la prolifération de LT effecteurs autologues mais ne diminuent pas la production de cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ) par les LT effecteurs et les monocytes autologues [394]. Ceci est lié à un défaut d'expression de CTLA-4 par les Treg puisque le niveau d'expression de cette molécule, indispensable à l'activité suppressive des Treg, est significativement diminué au cours de la PR par rapport à des sujets sains. De plus, l'induction *in vitro* de l'expression de CTLA-4 par les Treg de patients atteints de PR restore leurs capacités fonctionnelles. A l'inverse, le blocage de CTLA-4 altère la capacité des Treg de sujets sains à inhiber la production d'IFN- $\gamma$  par des LT effecteurs autologues mais pas leur capacité à en inhiber la prolifération. Ceci suggère que les Treg contrôlent la prolifération des LT et leur production de cytokines via des mécanismes différents [398]. De plus, certains polymorphismes du gène CTLA-4 sont associés à la PR [399] ou au lupus [400], démontrant l'importance de cette molécule au cours des processus physiopathologiques impliqués dans les pathologies dysimmunitaires.



Dans le liquide synovial, le nombre de Treg est augmenté au cours de la PR mais leur fonction est altérée en raison de l'environnement pro-inflammatoire (IL-6, IL-15, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) dans lequel ils se trouvent. Par exemple, l'IL-6 induit une résistance des LT effecteurs à l'effet immunosuppresseur des Treg [401]. *In vitro*, l'ajout de TNF- $\alpha$  dans les co-cultures de Treg et LT effecteurs inhibe l'action suppressive des Treg et diminue l'expression de FoxP3 [402]. De plus, et comme nous l'avons déjà évoqué, la réponse immunitaire T n'est pas figée mais est un processus dynamique. Ainsi, dans un environnement pro-inflammatoire comme la synoviale rhumatoïde ou une paroi artérielle affectée par l'ACG, les Treg pourraient se polariser en lymphocytes Th1 ou Th17. Cette plasticité des Treg vers la voie Th1 ou Th17 est sous le contrôle de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  ou l'IL-12 qui provoquent une méthylation des résidus CpG de FoxP3 donc une diminution de l'expression de FoxP3 puis une repolarisation vers la voie Th1 ou Th17 [364,403,404].

En résumé, dans la PR comme dans l'artérite à cellules géantes, nous avons assisté à un changement de paradigme : d'un modèle de déséquilibre de la balance Th1/Th2, nous avons évolué vers un modèle physiopathologique basé sur un déséquilibre de la balance Th17/Treg [83,147,148,405].

### ***Rôle de l'IL-6 dans le contrôle de la balance Th17/Treg***

La réponse immunitaire T n'est donc pas un processus figé mais dynamique. Même après qu'elle ait débuté, l'environnement cytokinique est capable de réorienter la réponse immunitaire T vers la tolérance ou l'inflammation. Cette notion de plasticité est capitale puisqu'elle permet de comprendre comment la persistance de signaux pro-inflammatoires va empêcher la résolution de la réponse immunitaire et aboutir à l'émergence de pathologies auto-immunes ou auto-inflammatoires. A l'inverse, cette notion de plasticité permet aussi, en modifiant l'environnement cytokinique grâce à l'utilisation de thérapies ciblées (anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$ , CTLA-4 Ig, anti-IL-6R par exemple), de manipuler la réponse immunitaire pour traiter les pathologies auto-immunes ou auto-inflammatoires.

Différentes cytokines sont impliquées dans le contrôle de ce phénomène de plasticité. Il a été clairement montré chez la souris que l'IL-6 était la cytokine majeure intervenant dans le contrôle de la balance Th17/Treg puisqu'en présence de TGF- $\beta$ , le LT CD4<sup>+</sup> naïf se polarise en Treg alors qu'en présence d'IL-6 et de TGF- $\beta$  il se différencie en lymphocyte Th17 [248]. D'ailleurs, des souris dont le gène de l'IL-6 est invalidé résistent à l'arthrite au collagène [406] et le traitement de souris par un anticorps anti-IL-6R (MR16-1) réduit la sévérité de l'arthrite au collagène [407].

En revanche, le rôle de l'IL-6 dans le contrôle de la balance Th17/Treg chez l'homme n'avait pas jusqu'alors été clairement démontré. Le tocilizumab est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le récepteur de l'IL-6, ce qui lui permet d'agir à la fois sur le récepteur membranaire et le récepteur soluble de l'IL-6. Il a montré son efficacité dans le traitement de la PR seul [408] ou en association avec le méthotrexate [409,410]. Il paraît également prometteur dans d'autres pathologies dysimmunitaires [411] et notamment dans le traitement de l'ACG [118-131].

Compte tenu de l'implication de l'IL-6 dans le contrôle de la balance Th17/Treg, nous avons étudié l'effet du blocage de la voie de l'IL-6 par le tocilizumab sur la balance Th17/Treg chez des patients atteints de PR. En effet, il existe dans la physiopathologie de la PR [412], comme de l'ACG [116,413], une implication forte de l'IL-6 et un déséquilibre de la balance Th17/Treg. Or, la PR est la première pathologie dans laquelle le tocilizumab a été officiellement indiqué.

**Article 6 : “Inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg imbalance in patients with rheumatoid arthritis”**

Dans cette étude, 15 patients (11 femmes et 4 hommes) avec une PR active (DAS28 médian = 5,53) ont été inclus et traités par tocilizumab (8 mg/Kg toutes les 4 semaines). Le traitement a dû être stoppé chez 3 patients en raison d'épisodes d'urticaire (n=2) ou de diarrhée fébrile (n=1). Finalement, des prélèvements sanguins ont été obtenus avant traitement et après 3 mois de traitement par tocilizumab chez 9 patients, analysés de façon appariée. Les données avant traitement ont également été comparées à celles issues de 17 volontaires sains.

En comparaison avec les sujets sains, nous avons mis en évidence que le pourcentage de lymphocytes Th17 était augmenté chez les patients ayant une PR active alors que celui des Treg circulants était significativement diminué. Les capacités fonctionnelles des Treg circulants, évaluées grâce à leur capacité à inhiber la prolifération de LT effecteurs autologues, n'étaient pas altérées chez les patients atteints de PR, même active. Ainsi, nous avons confirmé dans la première partie de cette étude qu'il existe au cours de la PR un déséquilibre de la balance Th17/Treg avec un excès de Th17 et un défaut de Treg.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons analysé l'évolution du pourcentage de lymphocytes Th17 et Treg circulants chez 9 patients répondeurs pour lesquels nous disposions d'un prélèvement avant et après 3 mois de traitement par tocilizumab. Nous avons alors mis en évidence, dans le sang circulant, une diminution significative du pourcentage de Th17 circulants et une augmentation simultanée du pourcentage de Treg circulants.

Ainsi, à l'inverse des corticoïdes pour lesquels nous avons montré qu'ils provoquaient au cours de l'ACG [83] une diminution du nombre de lymphocytes Th17 sans avoir d'effet sur le nombre de Treg, le tocilizumab, en bloquant directement la voie de l'IL-6 était capable, *in vivo*, de corriger la balance Th17/Treg en provoquant à la fois une inhibition de la voie Th17 et une promotion de la réponse T régulatrice.

Cette étude de preuve de concept nous a permis de montrer pour la première fois le rôle de l'IL-6 dans le contrôle de la balance Th17/Treg chez l'Homme, et nous a fourni une base physiopathologique solide pour utiliser ce traitement au cours de

l'ACG, pathologie dans laquelle il existe aussi un déséquilibre de la balance Th17/Treg (article 1).

## BRIEF REPORT

# Inhibition of Interleukin-6 Function Corrects Th17/Treg Cell Imbalance in Patients With Rheumatoid Arthritis

Maxime Samson,<sup>1</sup> Sylvain Audia,<sup>2</sup> Nona Janikashvili,<sup>1</sup> Marion Ciudad,<sup>1</sup> Malika Trad,<sup>1</sup> Jennifer Fraszczak,<sup>1</sup> Paul Ornetti,<sup>3</sup> Jean-Francis Maillefert,<sup>3</sup> Pierre Miossec,<sup>4</sup> and Bernard Bonnotte<sup>2</sup>

**Objective.** From an immunologic standpoint, the mechanisms by which treatment with tocilizumab (TCZ), a humanized anti-interleukin-6 (anti-IL-6) receptor antibody, results in improvement in rheumatoid arthritis (RA) patients are still not fully understood. In vitro studies and studies in mouse models have demonstrated the critical role of IL-6 in Th17 cell differentiation. Th17 lymphocytes have been shown to be strongly involved in RA pathogenesis, and the purpose of this study was to investigate the effect of IL-6 blockade on the balance between Th17 cells and Treg cells in patients with active RA.

**Methods.** Patients with active RA for whom TCZ had been prescribed by a rheumatologist were enrolled in this study. Phenotypic analyses of T cell populations were performed, and the Disease Activity Score in 28 joints (DAS28) was assessed. Serum cytokine levels and other parameters of inflammation were measured before the first infusion and after the third infusion of TCZ (8 mg/kg).

**Results.** Compared to controls, levels of Th17 cells (CD4+IL-17+) were increased and Treg cells (CD4+CD25<sup>high</sup>FoxP3+) were decreased in the peripheral blood of patients with active RA. The suppressive

function of circulating Treg cells was not impaired in patients with active RA. TCZ treatment induced a significant decrease in the DAS28 associated with a significant decrease in the percentage of Th17 cells (from a median of 0.9% to 0.45%;  $P = 0.009$ ) and an increase in the percentage of Treg cells (from a median of 3.05% to 3.94%;  $P = 0.0039$ ) in all patients.

**Conclusion.** This study demonstrates for the first time that inhibition of IL-6 function by TCZ corrects the imbalance between Th17 cells and Treg cells in patients with RA.

The balance between Th17 cells and Treg cells is of major importance in autoimmunity. In general, Th17 cells promote autoimmunity, whereas Treg cells protect against the occurrence of autoimmune diseases (1). In rheumatoid arthritis (RA), Th17 cells have been shown to play a central role by secreting interleukin-17 (IL-17), which activates numerous cell types involved in the pathogenesis of RA, including synovial fibroblasts, monocytes, macrophages, chondrocytes, and osteoblasts (2,3). In addition, RA is associated with the production of proinflammatory cytokines, such as IL-6, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), and IL-1 $\beta$ . Inhibition of IL-6 signaling by blocking the gp130 pathway or by knocking out the IL-6 gene significantly improves autoimmune arthritis in experimental animal models (4,5). Moreover, tocilizumab (TCZ), a humanized anti-IL-6 receptor antibody, has been shown to be an effective treatment for RA (6,7). However, why IL-6 blockade improves RA is still unclear since the cytokine may play a dual role. While IL-6 may trigger the hepatic acute-phase response and directly activate different cells such as B and T lymphocytes, macrophages, and osteoclasts, it may also act at an earlier stage in RA pathogenesis.

IL-6 has been shown to be of particular importance in Th17 cell differentiation in mice. The addition of IL-6 to murine CD4+ T cells cultured in the presence of transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) skews their

EudraCT database no. 2010-018696-21.

Supported by grants from the University Hospital of Dijon and clinical research department, Roche Chugai Laboratories, and the Regional Council of Burgundy.

<sup>1</sup>Maxime Samson, MS, Nona Janikashvili, PhD, Marion Ciudad, BS, Malika Trad, MS, Jennifer Fraszczak, PhD: INSERM, UMR 1098, Besançon, France, and Université de Bourgogne, UMR 1098, IFR 100, Dijon, France; <sup>2</sup>Sylvain Audia, MD, PhD, Bernard Bonnotte, MD, PhD: INSERM, UMR 1098, Besançon, France, and Université de Bourgogne, UMR 1098, IFR 100 and CHU Dijon le Bocage, Dijon, France; <sup>3</sup>Paul Ornetti, MD, PhD, Jean-Francis Maillefert, MD, PhD: CHU Dijon, Hôpital Général, Dijon, France; <sup>4</sup>Pierre Miossec, MD, PhD: Edouard Herriot Hôpital, Lyon, France.

Address correspondence to Bernard Bonnotte, MD, PhD, Université de Bourgogne, UMR 1098, CHU de Dijon, Bâtiment B2, 2 Boulevard Mal de Latre de Tassigny, 21000 Dijon, France. E-mail: bernard.bonnotte@u-bourgogne.fr.

Submitted for publication March 22, 2011; accepted in revised form March 15, 2012.

differentiation toward Th17 instead of immunosuppressive FoxP3<sup>+</sup> Treg cells (1). In humans, the mechanisms of Th17 cell differentiation are still incompletely characterized. While IL-6 has also been shown to promote Th17 cell polarization in vitro, previous reports have demonstrated that other cytokines, such as IL-1 $\beta$  and IL-23, are involved in this process as well (8). Unlike the mechanisms described in mice (1), TGF $\beta$  plays an indirect role in humans by inhibiting Th1 cell generation, and thereby enhancing polarization of Th17 cells from precursor cells defined by a CD161<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> phenotype (9,10).

In mice, it has been shown that blockade of the IL-6 pathway results in a decrease in the Th17 immune response (5). In patients with RA, TCZ has been demonstrated to induce clinical improvement and to reduce levels of various parameters of inflammation. However, whether the efficacy of TCZ may be related to its ability to negatively affect Th17 cell differentiation in vivo has not been investigated (6,7). In the current study, we used the ability of TCZ to inhibit IL-6 function in order to decipher the role of IL-6 on the immune balance between Th17 cells and Treg cells in patients with active RA.

## PATIENTS AND METHODS

**Study population.** Fifteen patients (11 women and 4 men) fulfilling the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism 2010 criteria for RA (11), with a median Disease Activity Score in 28 joints (DAS28) (12) of 5.53 (interquartile range [IQR] 4.32–6.31), for whom TCZ was prescribed by a rheumatologist, were enrolled in this study. Informed consent was obtained from all patients. The study was approved by the local ethics committee (2010-018696-21). All patients had seropositive RA, with a median duration of 11 years (IQR 4–13 years). They had all previously received methotrexate (MTX), and 6 of them (40%) were still receiving MTX when TCZ was started. Patients had received a median of 2 courses of therapy with biologic agents (IQR 1–3) before they began treatment with TCZ, including infliximab (n = 5), etanercept (n = 12), adalimumab (n = 7), certolizumab (n = 1), rituximab (n = 5), anakinra (n = 1), and abatacept (n = 3). Because of persistently active disease, 11 patients (73.33%) were also treated with steroids at a median daily dose of 20 mg of prednisone (IQR 10–40). TCZ was prescribed monthly at a dose of 8 mg/kg for all patients. Blood samples were collected just before the first and fourth infusions of TCZ. TCZ treatment was stopped in 2 patients before trial completion because of urticaria and in 1 patient because of diarrhea with fever. Paired data from 6 women and 3 men with a median age of 56 years (IQR 37–63 years), a median disease duration of 10 years (IQR 3.5–12.5 years), and a median baseline DAS28 score of 5.53 (IQR 4.37–6.16) were analyzed before and after TCZ treatment.

The control group consisted of 17 healthy volunteers. The controls had no evidence of an inflammatory syndrome (serum levels of C-reactive protein <0.5 mg/dl), no history of cancer, no recent acute or chronic infectious diseases, and no autoimmune or autoinflammatory diseases, and had not recently been treated with steroids or immunosuppressive drugs.

**Cell preparation, culture, and flow cytometry.** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by Ficoll gradient centrifugation. CD4<sup>+</sup> T cells were then purified by magnetic-activated cell sorting (Miltenyi Biotec) and stimulated with 0.1  $\mu$ g/ml of phorbol myristate acetate (PMA) and 1  $\mu$ g/ml of ionomycin (Sigma-Aldrich) for 8 hours; 1  $\mu$ l/ml of brefeldin A (Golgi Plug; BD Biosciences) was added for the last 4 hours. The cells were stained with phycoerythrin (PE)–conjugated anti-IL-17A and allophycocyanin (APC)–conjugated anti-interferon- $\gamma$  (anti-IFN $\gamma$ ) monoclonal antibodies (eBioscience). CD4<sup>+</sup> lymphocytes were isolated before cytokine staining since stimulation with PMA triggers the internalization and degradation of CD4, which disturbs the identification of Th1 (CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>) and Th17 (CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>) cells (13). Treg cells (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>) were stained with PE–Cy5.5–conjugated anti-CD4, PE-conjugated anti-CD25, and Alexa Fluor 488–conjugated anti-FoxP3 (Human Treg Flow Kit) according to the instructions of the manufacturer (BioLegend Ozyme). Flow cytometric staining was performed and the results analyzed using the cytometry platform at the Institut Fédératif de Recherche 100, using an LSRII flow cytometer (BD Biosciences) and FlowJo software.

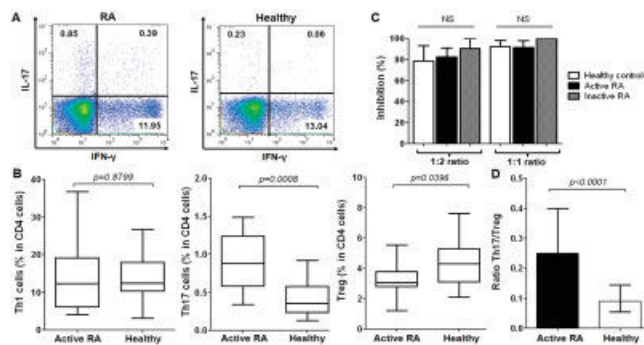
**Proliferation assays.** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> (Treg) and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>–</sup> (T effector) cells were isolated from PBMCs using a human Treg cell isolation kit according to the instructions of the manufacturer (Miltenyi Biotec). T effector cells were stained with a cell trace violet cell proliferation kit (Invitrogen) and cultured with or without anti-CD2/CD3/CD28 microbeads (Treg Cell Suppression Inspector; Miltenyi Biotec) and Treg cells, as indicated. After 4 days of culture, cell trace dilution was analyzed by flow cytometry, and the proliferation index was calculated using ModFit LT 3.0 software.

**Cytokine assays.** Serum levels of IL-17A, IL-1 $\beta$ , and IL-6 were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (eBioscience).

**Statistical analysis.** Wilcoxon's signed rank test was used to compare parameters in individual patients before and after treatment. The Mann-Whitney U test was used to compare patients before treatment with the control group. *P* values less than 0.05 (2-tailed) were considered significant. Data are presented as the median (IQR). Analyses were performed using GraphPad Prism software.

## RESULTS

**Increased levels of Th17 cells and decreased levels of Treg cells in patients with active RA.** The percentage of circulating Th17 cells (CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>) was significantly increased in RA patients (median 0.88%; n = 15) compared to controls (0.36%; n = 17) (*P* = 0.0008) (Figures 1A and B). Analyses confirmed that these cells exhibit a phenotype consistent with that of Th17 lymphocytes (CCR6<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CD45RA<sup>–</sup>) in



**Figure 1.** Increased circulating Th17 cells and decreased, but functional, Treg cells in patients with rheumatoid arthritis (RA). **A** and **B**, Flow cytometric analysis of Th1 (CD4+IL-17-IFN $\gamma$ +), Th17 (CD4+IL-17+), and Treg (CD4+CD25<sup>high</sup>Foxp3+) cells in RA patients (n = 15) and healthy subjects (n = 17) was performed (**A**), and the results were quantified (**B**). **C**, Functional analysis of Treg cells (CD4+CD25<sup>high</sup>) was performed, and the proliferation index was measured using ModFit LT 3.0 software. The percentage of inhibition was calculated using the proliferation index of stimulated T effector cells without Treg cells as the reference. The percentage of inhibition at a 1:2 ratio and a 1:1 ratio of Treg cells to T effector cells was compared in patients with active RA (n = 6), patients with inactive RA after treatment with tocilizumab (n = 3), and healthy controls (n = 6). **D**, The ratio of Th17 cells to Treg cells in patients with RA (n = 15) and healthy subjects (n = 17) was determined. Data in **B** are shown as box plots. Each box represents the interquartile range (IQR). Lines inside the boxes represent the median. Whiskers represent the highest and lowest values. Histograms in **C** and **D** represent the median and IQR. *P* values were determined by Mann-Whitney U test (**B** and **D**) or Kruskal-Wallis test (**C**). IL-17 = interleukin 17; IFN $\gamma$  = interferon- $\gamma$ ; NS = not significant.

both groups (data not shown). In contrast, no difference in the percentage of Th1 cells (CD4+IL-17-IFN $\gamma$ +) was observed between RA patients (12.30%) and

healthy subjects (12.42%) ( $P = 0.8799$ ) (Figures 1A and 1B). The percentage of Treg cells (CD4+CD25<sup>high</sup>Foxp3+) was reduced in patients with active RA (3.05%) as compared to controls (4.31%) ( $P = 0.0396$ ) (Figure 1B). However, the immunosuppressive function of Treg cells (CD4+CD25<sup>high</sup>) was not different between RA patients and healthy volunteers (Figure 1C). The median ratio of Th17 cells to Treg cells was increased in patients with RA (0.25) as compared to controls (0.09) ( $P < 0.0001$ ) (Figure 1D). IL-6 was increased in the serum of some but not all patients with active RA, whereas it was not detected in the serum of healthy controls ( $P = 0.006$ ) (data not shown). The serum levels of IL-17 and IL-1 $\beta$  were very low and not different between RA patients and healthy controls (data not shown).

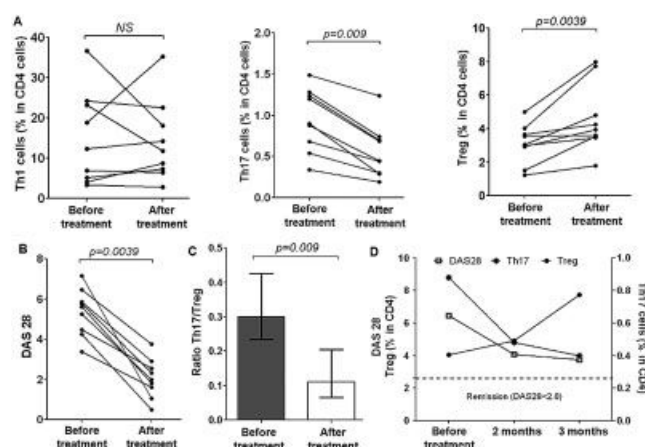
**TCZ-induced reduction in the ratio of Th17 cells to Treg cells.** In all 9 patients, RA responded to TCZ treatment, as demonstrated by a significant decrease in the DAS28 (Table 1 and Figure 2B). No significant difference was seen in the evolution of neutrophils or CD4 and CD8 T lymphocytes after TCZ treatment (Table 1). Blockade of IL-6 with TCZ did not significantly modify the levels of Th1 lymphocytes (Figure 2A). Interestingly, a significant decrease in the percentage of Th17 cells was detected after TCZ treatment, from a median of 0.9% to 0.45% of total CD4+ cells ( $P = 0.009$ ) (Figure 2A). In contrast, TCZ administration resulted in an increase in the percentage of Treg cells, from a median of 3.05% to 3.94% of total CD4+ cells ( $P = 0.0039$ ) (Figure 2A). Importantly, Treg cells from TCZ-treated patients were still capable of suppressing the proliferation of autologous T effector cells

**Table 1.** Characteristics of the patients with rheumatoid arthritis before and after treatment with TCZ\*

	Before treatment, median (IQR)	After treatment, median (IQR)	<i>P</i>
Leukocytes, gm/liter	10,400 (7,800–11,055)	8,000 (6,150–10,380)	0.4409
Neutrophils, gm/liter	4,990 (4,040–7,677)	3,580 (2,372–6,660)	0.4258
Lymphocytes, gm/liter	2,461 (1,300–3,793)	2,930 (2,440–3,352)	0.3594
T cells, gm/liter	1,936 (877–2,715)	2,250 (2,085–2,780)	0.4258
CD4+ T cells, gm/liter	1,477 (577–1,842)	1,536 (1,080–1,823)	0.25
CD8+ T cells, gm/liter	605 (277–873)	576 (501–922)	0.6523
B cells, gm/liter	194 (92–375)	248 (104–363)	0.7344
DAS28	5.61 (4.37–6.16)	2.00 (1.34–2.73)	0.0039
Tender joint count	4 (2.5–12)	2 (0–3.5)	0.0249
Swollen joint count	8 (2–19)	1 (0–3.5)	0.0156
ESR, mm/hour	28 (13.8–60.8)	2 (2–4.5)	0.0078
Patient global assessment, 1–100–mm VAS	70 (53–73)	20 (20–38)	0.009
C-reactive protein, mg/liter	13 (4–70.4)	2 (0.5–2.5)	0.0078
Prednisone, mg/day	10 (4.5–50)	9 (0–17.5)	0.125

\* Four infusions of tocilizumab (TCZ; 8 mg/kg) were administered 1 month apart. IQR = interquartile range; DAS28 = Disease Activity Score in 28 joints; ESR = erythrocyte sedimentation rate; VAS = visual analog scale.





**Figure 2.** Link between clinical response to tocilizumab (TCZ) and correction of the ratio of Th17 cells to Treg cells in patients with rheumatoid arthritis. **A**, Percentages of Th1, Th17, and Treg cells in 9 patients before and after TCZ treatment. **B**, Disease Activity Score in 28 joints (DAS28) before and after treatment. **C**, Ratio of Th17 cells to Treg cells before and after treatment. **D**, Evolution of the DAS28 and the percentages of Treg cells and Th17 cells during TCZ treatment in 1 patient. Values are the median and interquartile range. *P* values were determined by Wilcoxon's signed rank test. NS = not significant.

(Figure 1C). Thus, TCZ induced a clinical improvement associated with a correction of the ratio of Th17 cells to Treg cells, from a median of 0.3 to 0.11 ( $P = 0.009$ ) (Figure 2C). The serum level of IL-6 was not significantly modified by TCZ (from a median of 13.14 pg/ml before treatment to 8.43 pg/ml after treatment;  $P = 0.6406$ ) (data not shown). Interestingly, we observed that Th17 cells began to decrease and Treg cells to increase before the complete remission of the disease (DAS28 score <2.6) (Figure 2D).

## DISCUSSION

This study confirmed the major imbalance between Th17 cells and Treg cells in patients with active RA, as previously reported in the literature (14,15). Furthermore, we have demonstrated that the Th17/Treg cell imbalance occurring in patients with RA can be corrected by TCZ-mediated blockade of IL-6 signals, which is associated with improved clinical outcome. These results emphasize the benefit of therapeutic approaches based on inhibition of Th17 cells and/or promotion of Treg cells in RA. By blocking the IL-6 pathway, TCZ may decrease IL-6-induced inflammation and/or affect Treg cell and Th17 cell differentiation.

Interestingly, levels of IL-6 were not elevated in the serum of all RA patients. Furthermore, TCZ treat-

ment did not induce a significant decrease in serum IL-6 concentrations, whereas clinical improvement associated with a decrease in the ratio of Th17 cells to Treg cells was observed in all of these patients. These results therefore suggest that reduction of IL-6-induced inflammation may not be the primary mode of action of TCZ. Since TCZ corrects the Th17/Treg cell imbalance in RA patients before complete clinical remission has occurred, the modulation of these 2 antagonistic lymphocyte subsets may represent a likely mechanism of action of TCZ underlying its clinical efficacy. Evidence has been provided that T helper lymphocytes can be redirected to other lineages depending on the cytokine environment (15). In fact, that environment can differentially activate master regulator genes (such as T-bet, GATA-3, and retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor  $\gamma$ ), which, in association with proteins such as STAT-3, STAT-4, STAT-5, STAT-6, or suppressor of cytokine signaling 3, change T helper cell polarization (16).

Although additional studies are needed to identify the molecular bases controlling TCZ-mediated Treg cell increase and Th17 cell reduction, the present study demonstrates for the first time that *in vivo* inhibition of IL-6 function with TCZ can restore a physiologic Th17/Treg cell balance in patients with RA. This study opens a potential new avenue for therapy, or for monitoring of current anticytokine therapies, in RA and other autoimmune diseases in which IL-6, Treg cells, and/or Th17 cells may be involved.

## ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Corinne Chevalier for her help with the collection of clinical data and Serge Aho-Glele for conducting the statistical analyses.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Dr. Bonnotte had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

**Study conception and design.** Samson, Maillefert, Bonnotte.

**Acquisition of data.** Samson, Audia, Ciudad, Trad, Fraszczak, Ornetti, Maillefert, Bonnotte.

**Analysis and interpretation of data.** Samson, Janikashvili, Miossec, Bonnotte.

## ROLE OF THE STUDY SPONSOR

Roche Chugai Laboratories had no role in the study design or in the collection, analysis, or interpretation of the data, the writing of the manuscript, or the decision to submit the manuscript for publication. Publication of this article was not contingent upon approval by Roche Chugai Laboratories.



## REFERENCES

1. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235–8.
2. Miossec P. Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy [review]. *Arthritis Rheum* 2003;48:594–601.
3. Miossec P. Interleukin-17 in fashion, at last: ten years after its description, its cellular source has been identified [review]. *Arthritis Rheum* 2007;56:2111–5.
4. Boe A, Baiocchi M, Carbonatto M, Papoian R, Serlupi-Crescenzi O. Interleukin 6 knock-out mice are resistant to antigen-induced experimental arthritis. *Cytokine* 1999;11:1057–64.
5. Nowell MA, Williams AS, Carty SA, Scheller J, Hayes AJ, Jones GW, et al. Therapeutic targeting of IL-6 trans signaling counteracts STAT3 control of experimental inflammatory arthritis. *J Immunol* 2009;182:613–22.
6. Genovese MC, McKay JD, Nasonov EL, Mysler EF, da Silva NA, Alecock E, et al. Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in rheumatoid arthritis with inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs: the Tocilizumab in Combination With Traditional Disease-Modifying Antirheumatic Drug Therapy study. *Arthritis Rheum* 2008;58:2968–80.
7. Smolen JS, Beaulieu A, Rubbert-Roth A, Ramos-Remus C, Rovensky J, Alecock E, et al. Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet* 2008;371:987–97.
8. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor- $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 2007;8:942–9.
9. Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, et al. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med* 2008;205:1903–16.
10. Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, Querci V, De Palma R, et al. TGF- $\beta$  indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *Eur J Immunol* 2009;39:207–15.
11. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO III, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010;62:2569–81.
12. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts: development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:44–8.
13. Hennessy B, North J, Deru A, Llewellyn-Smith N, Lowdell MW. Use of Leu3a/3b for the accurate determination of CD4 subsets for measurement of intracellular cytokines. *Cytometry* 2001;44:148–52.
14. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF $\alpha$  therapy. *J Exp Med* 2004;200:277–85.
15. Wang W, Shao S, Jiao Z, Guo M, Xu H, Wang S. The Th17/Treg imbalance and cytokine environment in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2012;32:887–93.
16. Peck A, Mellins ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology* 2010;129:147–53.

Dans cette étude, nous avons montré que le blocage de la voie de l'IL-6 permet de corriger le déséquilibre de la balance Th17/Treg, en induisant à la fois une inhibition de la voie Th17 et une promotion de la réponse T régulatrice.

Néanmoins, il est difficile de savoir si la correction de la balance Th17/Treg est un effet direct du tocilizumab, via le blocage de la voie de signalisation de l'IL-6, ou seulement la conséquence du fait que la maladie soit en rémission, grâce au traitement, mais via d'autres mécanismes.

Dans notre étude, nous tentons de répondre à cette question en montrant le cas d'un patient chez qui nous avons observé une diminution progressive du pourcentage de Th17 et une augmentation synchrone du pourcentage de Treg avant que le DAS28 ne descende en dessous de 2,6, seuil où l'on considère la maladie en rémission.

On peut également tenter de répondre à cette question en analysant l'effet d'autres traitements sur la balance Th17/Treg. Comme nous l'avons vu au cours de l'ACG [83], les corticoïdes entraînent une diminution spectaculaire du nombre de lymphocytes Th17 circulants mais n'ont pas d'effet sur le nombre de Treg, ce qui est aussi le cas au cours de la PR [393]. De même, au cours de la PR, le méthotrexate n'a pas d'effet sur le pourcentage de Treg circulants [396,414] mais diminue celui des lymphocytes Th17 circulants [415]. Pour les anti-TNF- $\alpha$ , les données sont plus nombreuses. Ils provoquent une diminution du pourcentage de lymphocytes Th17 circulants [415,416] et ont un effet variable sur le nombre de Treg circulants : augmentation de leur pourcentage dans certaines études [394,416,417] ou absence d'effet dans une autre [396]. L'effet des anti-TNF- $\alpha$  sur la fonction suppressive des Treg a également été étudié. Au cours de la PR, l'infliximab est capable de restaurer la capacité des Treg à inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires par des LT effecteurs autologues [394]. L'équipe de M. Ehrenstein a récemment montré, qu'à l'inverse de l'éta nercept, l'adalimumab provoquait une augmentation du pourcentage de Treg circulants et une diminution du pourcentage de Th17 circulants. De plus, seuls les Treg des patients traités par adalimumab étaient capables d'inhiber la production d'IL-17 par les LT effecteurs via un mécanisme indépendant du contact cellulaire et de la production d'IL-10 ou de TGF- $\beta$ , mais lié au fait que les Treg de patients traités par adalimumab (à l'inverse des patients non traités ou traités par

étanercept) étaient les seuls à inhiber la production d'IL-6 par les monocytes autologues. Finalement, l'utilisation d'un anticorps bloquant l'IL-6 avait le même effet inhibiteur sur la production d'IL-17 par les LT effecteurs que les Treg de patients traités par adalimumab [417].

Comme le tocilizumab, les anti-TNF- $\alpha$ , et notamment l'infliximab ou l'adalimumab, sont donc capables d'inhiber la réponse Th17 et de promouvoir la réponse T régulatrice mais via un mécanisme dépendant de l'IL-6. Ceci confirme donc le rôle primordial de l'IL-6 dans le contrôle de la balance Th17/Treg et plaide en faveur d'un effet direct du tocilizumab sur la restauration de cette balance au cours de la PR.

## **2. Article 7 : “Does tocilizumab indeed decrease the frequency of Th17 cells: comment on the paper from Thiolat A. *et al.*”**

Dans une étude récente, A. Thiolat *et al.* ont également étudié l'effet du tocilizumab sur le pourcentage de lymphocytes Th17 et Treg au cours de la PR et dans le modèle murin de l'arthrite au collagène [418]. Ils ont confirmé que le pourcentage de Treg circulants augmentait après traitement par tocilizumab et que, chez les patients répondeurs au traitement, le pourcentage de Treg CD39<sup>+</sup>, dont la fonction suppressive est plus forte que celle des Treg CD39<sup>-</sup>, était plus élevé que chez ceux chez qui les critères de rémission [419] n'étaient pas obtenus.

En revanche, les auteurs n'ont pas mis en évidence de diminution du pourcentage de lymphocytes Th17 après 3 mois de traitement par tocilizumab [418].

Dans cette lettre de réponse, nous tentons donc d'expliquer les différences entre l'étude de Thiolat *et al.* [418] et la notre (article 6) [420].

Tout d'abord, le phénotype utilisé pour identifier les lymphocytes Th17 n'était pas le même dans les 2 études. En utilisant le même phénotype que dans l'étude de Thiolat *et al.* (CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>) [418], nous avons analysé le pourcentage de lymphocytes Th17 circulants chez 13 patients appariés dont les prélèvements ont été obtenus avant et après 3 mois de traitement par tocilizumab. Comme dans notre

première étude [420], nous avons confirmé, avec un effectif de patients supérieur, et quelle que soit la définition phénotypique des lymphocytes Th17, que le tocilizumab provoquait une diminution du pourcentage de Th17 circulants.

Dans notre étude, tous les patients présentaient une PR active au moment de l'inclusion et nous avons alors montré que ceci était associé avec une augmentation du pourcentage de lymphocytes Th17 circulants par rapport à une population de sujets sains. Dans l'étude de Thiolat *et al.* [418], comme dans celle de Pesce *et al.* [421], le pourcentage de lymphocytes Th17 circulants des patients avant traitement par tocilizumab n'a pas été comparé à celui d'une population témoin. Il est donc possible que les auteurs n'aient pas mis en évidence de diminution du pourcentage de lymphocytes Th17 circulants car ces derniers n'étaient pas significativement augmentés avant que le tocilizumab ne soit débuté.

DOI 10.1002/art.38718

# Does tocilizumab indeed reduce the frequency of Th17 cells? Comment on the article by Thiolat et al

To the Editor:

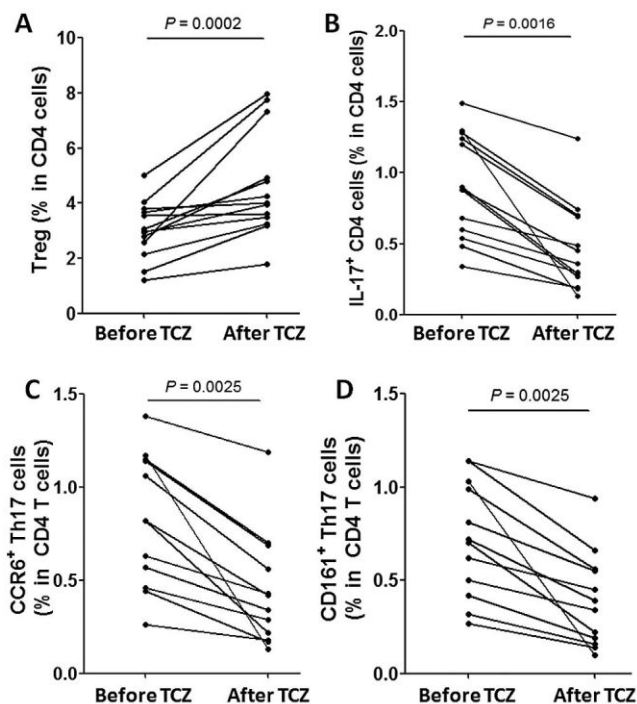
We read with great interest the report by Thiolat et al describing their assessment of the effect of tocilizumab (TCZ), an anti-interleukin-6 (anti-IL-6) receptor humanized monoclonal antibody, on Th17 and Treg cell frequencies in rheumatoid arthritis (RA) (1). Those authors confirmed our finding of an increase in the percentage of Treg cells (CD25<sup>high</sup>FoxP3+CD4+) following TCZ therapy (2) whereas, unlike the findings of our study, Th17 cell frequency was not affected in their study, even in responders (1).

This striking discrepancy between the two studies may be related to the different phenotypes used to define Th17 cells: CCR6+IL-17+CD4+ cells in Thiolat and colleagues' study (1) and IL-17+CD4+ cells in ours (2). However, we ruled out this hypothesis by confirming a decrease in the Th17 cell percentage following TCZ treatment regardless of the phenotype used for the definition (mean 0.82% and 0.44% before and after treatment, respectively, for CCR6+IL-17+CD4+ cells, 0.72% and 0.39%, respectively, for CD161+IL-17+CD4+ cells, and 0.91 to 0.46%, respectively, for IL-17+CD4+ cells) (Figure 1). We also confirmed that the percentage of Treg cells was significantly increased after 3 months of treatment in all patients (from a mean of 3.02% to 4.64%) (Figure 1), including the 1 patient who was a TCZ nonresponder, thus supporting the concept that the correction of the Th17/Treg cell ratio is a direct effect of TCZ rather than only a surrogate marker for disease remission.

Differences in disease activity could also explain these discrepancies between the two studies. Of the 13 patients analyzed in our study (2), all had active disease associated with an increase in Th17 cell levels before TCZ treatment, and 12 of the 13 met the European League Against Rheumatism criteria for good response (3) after TCZ treatment, which correlated with a correction of the Th17/Treg cell imbalance. In the report by Thiolat et al (1), data on Th17 cell levels before TCZ treatment, when RA was active, are not provided. Therefore, unlike in our study, Th17 cell percentages at baseline might not have been increased in their patients—similar to the findings in the patients studied by Pesce et al (4)—thus explaining why Th17 levels did not decrease following TCZ administration in these latter studies (1,4).

Recent research has highlighted the plasticity between FoxP3+ T cells and Th17 cells. In a murine model of collagen-induced arthritis, CD25<sup>low</sup>FoxP3+CD4+ T cells lost FoxP3 expression and were polarized into Th17 cells in vivo through an IL-6-dependent mechanism (5). We hypothesize that blockade of the IL-6 pathway by TCZ could prevent such conversion, thus resulting in a correction of the Th17/Treg cell imbalance observed in treated RA patients (2).

Supported by grants from the University Hospital of Dijon and Recherche Clinique (Appel Offre Interne 2010), Roche Chugai Laboratories, and the Regional Council of Burgundy. We thank Malika Trad, Marion Ciudad, and Alexandrine Gautheron for their contributions to the study. We are grateful to Corinne Chevalier for assistance with collection of clinical data and Serge Aho-Glele for assistance with statistical analysis.



**Figure 1.** Inhibition of the interleukin-6 (IL-6) pathway increases circulating Treg cell frequencies and decreases circulating Th17 cell frequencies. Levels of Treg cells (CD25<sup>high</sup>FoxP3+CD4+) (A) and of Th17 cells defined as IL-17+CD4+ cells (B), as IL-17+CCR6+CD4+ cells (C), and as IL-17+CD161+CD4+ cells (D) in 13 rheumatoid arthritis patients before and after tocilizumab (TCZ) treatment were assessed by flow cytometry. *P* values were determined by Wilcoxon's signed rank test.

Maxime Samson, MD  
Sylvain Audia, MD, PhD  
INSERM U1098

Besançon, France

Université de Bourgogne Franche-Comté UMR1098  
and CHU de Dijon  
Dijon, France

Paul Ornetti, MD, PhD  
Jean-François Maillefert, MD, PhD  
CHU de Dijon

Dijon, France

Nona Janikashvili, PhD  
INSERM U1098

Besançon, France

and Université de Bourgogne Franche-Comté UMR1098  
Dijon, France

Bernard Bonnotte, MD, PhD  
INSERM U1098

Besançon, France

Université de Bourgogne Franche-Comté UMR1098  
and CHU de Dijon  
Dijon, France

- Thiolat A, Semerano L, Pers YM, Biton J, Lemeiter D, Portales P, et al. Interleukin-6 receptor blockade enhances CD39+ regulatory

- T cell development in rheumatoid arthritis and in experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:273–83.
2. Samson M, Audia S, Janikashvili N, Ciudad M, Trad M, Fraszczak J, et al. Inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg cell imbalance in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2012;64:2499–503.
  3. Van Gestel AM, Prevoo ML, van 't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB, van Riel PL. Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis: comparison with the preliminary American College of Rheumatology and the World Health Organization/International League Against Rheumatism criteria. *Arthritis Rheum* 1996;39:34–40.
  4. Pesce B, Soto L, Sabugo F, Wurmman P, Cuchacovich M, Lopez MN, et al. Effect of interleukin-6 receptor blockade on the balance between regulatory T cells and T helper type 17 cells in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Immunol* 2013;171:237–42.
  5. Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Nakashima T, Oh-hora M, Kodama T, et al. Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med* 2014;20:62–8.

DOI 10.1002/art.38717

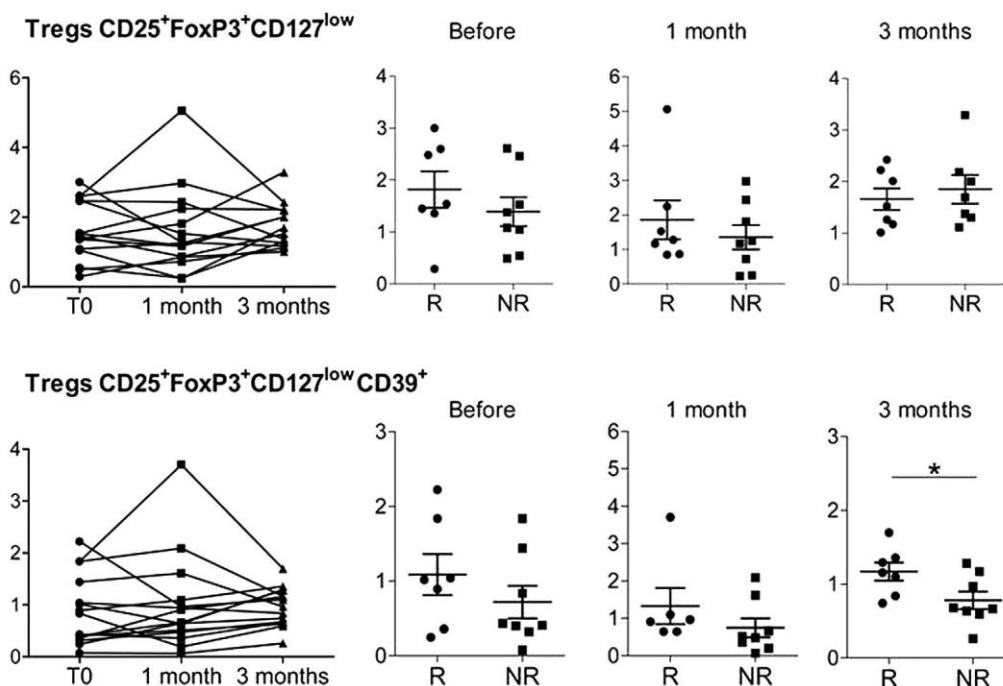
## Reply

To the Editor:

We appreciate the interest of Dr. Sarantopoulos et al and Dr. Samson et al in our report on the effect of IL-6 receptor inhibition on Treg cells in arthritis.

Sarantopoulos and colleagues provide data on the variation of Treg cell levels in TCZ-treated RA patients at an early time point after treatment initiation, and then every month through 11 months of treatment. Their main finding is that, as early as 1 month after the first TCZ infusion, Treg cell frequency increases in RA patients. Although the data were not included in our article, we also had studied Treg cell variation at this early time point. As shown in Figure 1, the frequency of Treg cells (defined as CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> cells) among CD4<sup>+</sup> T cells did not increase between baseline and 1 month after the first TCZ infusion. This apparent discrepancy could be explained by the fact that in our study, unlike that of Sarantopoulos et al, CD127<sup>low</sup> was included in the definition of Treg cells, to better delineate the Treg cell population (1). In addition, we retrospectively (at 3 months, i.e., an appropriate time point for accurate clinical evaluation) classified patients into responder and nonresponder groups according to the European League Against Rheumatism response criteria (2). Interestingly, even in a pooled group of all of our responder and nonresponder patients combined, Treg cell frequency did not increase after 1 month.

Our study also yielded other information about Treg cells since we investigated the expression of the CD39 marker, which is an ectonucleotidase that is able to hydrolyze ATP, thus improving Treg cell suppressive activity. As we mentioned in our earlier report but with data not shown and as now shown in Figure 1, the frequency of CD39<sup>+</sup> Treg cells increased in RA patients who were TCZ responders as early as 1 month following treatment induction, but this increase reached statis-



**Figure 1.** Frequency of Treg cells and CD39<sup>+</sup> Treg cells in 15 RA patients at baseline and after 1 month and 3 months of TCZ treatment. The percentages of Treg cells (CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>) and CD39<sup>+</sup> Treg cells within the peripheral CD4<sup>+</sup> cell population were compared. Patients were classified as responders (R; n = 7) or nonresponders (NR; n = 8) according to the European League Against Rheumatism response criteria. A significant difference in the frequency of CD39<sup>+</sup> Treg cells between responders and nonresponders was observed after 3 months (\* =  $P < 0.05$  by Mann-Whitney test). Each symbol represents an individual patient; bars show the mean  $\pm$  SEM.

Il a récemment été montré chez la souris qu'il faut distinguer 2 populations distinctes parmi les LT CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> : les LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> qui correspondent à des Treg et qui sont stables *in vivo* et les LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup> qui sont *instables in vivo* et qui se polarisent en d'autres types de LT *helper* [422]. Ceci rejoint le concept de plasticité des Treg [364]. Dans une étude très récente [423], les auteurs sont parvenus à démontrer dans le modèle de l'arthrite au collagène que ces CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup> perdaient *in vivo* l'expression de FoxP3 et se polarisaient en lymphocytes Th17 qui aggravaient les lésions d'arthrite. Cette conversion des CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup> en « exFoxP3 » Th17 dépendait de la production d'IL-6 par les synoviocytes articulaires et pouvait être bloquée en utilisant un anticorps bloquant l'IL-6.

Cette étude montre donc, qu'*in vivo*, l'IL-6 est directement impliquée dans la repolarisation des LT CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> en lymphocytes Th17 pathogènes et qu'ainsi, l'excès d'IL-6 conduit *in fine* à déséquilibrer la balance Th17/Treg.

### **3. Réponse T régulatrice au cours de l'ACG**

L'IL-6 joue donc un rôle capital dans le contrôle de la balance Th17/Treg.

Dans l'article 1 [83], nous avons montré qu'il existait aussi au cours de l'ACG un déséquilibre de la balance Th17/Treg avec un excès de lymphocytes Th17 et un défaut quantitatif en Treg. Le rôle de l'IL-6 dans la physiopathologie de l'ACG est aussi bien documenté : sa concentration est corrélée à l'activité de la maladie et aux marqueurs usuels de l'inflammation, diminue sous traitement par corticoïdes et augmente en cas de rechute [116,413], ce que nous avons également confirmé dans l'article 1 [83].

Comme nous l'avons déjà évoqué, malgré leur capacité à diminuer la concentration d'IL-6, les corticoïdes ne permettent pas de corriger le déficit quantitatif en Treg constaté chez les patients atteints d'ACG ou de PPR [83]. Notre hypothèse est que ce défaut de restauration d'une réponse T régulatrice suffisante joue probablement un rôle dans la survenue de rechutes lors de la décroissance des doses de corticoïdes.

L'ensemble de ces données constitue un rationnel fort pour utiliser le tocilizumab au cours de l'ACG. Ce traitement a déjà été utilisé avec succès et de manière empirique par plusieurs équipes [118-131]. C'est la raison pour laquelle nous avons démarré une étude de preuve de concept évaluant l'intérêt du tocilizumab en association avec la corticothérapie dans le traitement de l'ACG. Cette étude de phase II, financée par un PHRC national, est en cours et les premières inclusions ont débuté en mars 2014.



# ETUDE DES LYMPHOCYTES T CD8 AU COURS DE L'ACG ET LA PPR

---

## 1. Introduction

### ***Ontogénie, activation et différenciation des LT CD8<sup>+</sup>***

Après leur synthèse au niveau médullaire, une partie des précurseurs lymphoïdes vont quitter la moelle osseuse et gagner le thymus pour poursuivre leur différenciation en LT. Selon les gènes qui se recombinent pour permettre la synthèse du TCR (*T Cell Receptor*), vont être produits 2 types de LT : les LT  $\gamma\delta$  et les LT  $\alpha\beta$ . Les LT  $\gamma\delta$  se situent essentiellement au niveau des muqueuses où ils prennent part à la réponse immunitaire innée et peuvent aussi jouer le rôle de CPA [424]. Quant aux LT  $\alpha\beta$ , après un stade double négatif ( $CD3^+CD4^-CD8^-$ ) puis double positif ( $CD3^+CD4^+CD8^+$ ), ils vont se différencier en LT CD4<sup>+</sup> dont le TCR reconnaît une séquence peptidique présentée au sein d'un CMH de classe II (CMH-II) ou LT CD8<sup>+</sup> dont le TCR reconnaît des peptides présentés au sein d'un CMH-I. Ces LT CD4 et CD8 migrent ensuite dans la médulla thymique où sont éliminés par apoptose les LT dont le TCR reconnaît avec une forte affinité les auto-antigènes : c'est la sélection négative [425,426]. Les autres LT survivent et expriment alors le récepteur de la sphingosine-1-phosphate (S1P1) puis quittent le thymus pour la circulation périphérique et les organes lymphoïdes secondaires [427].

Comme pour les LT CD4<sup>+</sup>, on distingue quatre sous-types de LT CD8<sup>+</sup>, correspondant à différents niveaux d'activation, de différenciation et de capacités effectrices (cytotoxicité et production de cytokines) : les LT CD8<sup>+</sup> naïfs, effecteurs, mémoires centraux (*Central Memory*) et mémoires effecteurs (*Effector Memory*). Les LT CD8<sup>+</sup> naïfs n'ont jamais rencontré d'antigène. Ils expriment CCR7, CD62L, l'isoforme RA du CD45 ( $CD45RA^+CD45RO^-$ ) et se situent essentiellement dans le sang périphérique et les organes lymphoïdes secondaires. Lorsqu'ils rencontrent l'antigène dont ils sont spécifiques, présenté au sein d'un CMH-I par une CPA, les LT CD8<sup>+</sup> naïfs s'activent, prolifèrent de façon clonale et acquièrent des propriétés effectrices. Les LT CD8<sup>+</sup> effecteurs perdent alors l'expression de CCR7, de CD62L, de CD27 et de CD28. Ils migrent ensuite vers le lieu de la réponse inflammatoire

pour y exercer leurs fonctions effectrices : cytotoxicité et production de cytokines. Une fois que l'antigène a disparu, 90 à 95% des LT effecteurs vont mourir par apoptose : c'est la contraction clonale. Les 5 à 10% de LT survivants vont persister sous la forme de LT mémoires centraux qui expriment l'isoforme RO du CD45 (CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>), CCR7 et CD62L mais aussi CD28 et CD27. Les LT CD8 mémoires centraux se trouvent essentiellement dans les organes lymphoïdes secondaires. Ils constituent un réservoir d'effecteurs potentiels, sont capables d'être activés et de proliférer très rapidement en cas de nouvelle rencontre avec l'antigène dont ils sont spécifiques. Dans ce cas, ils se différencient en LT CD8 mémoires effecteurs, qui ont une action cytotoxique puissante et qui sont définis par le phénotype CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup> [425,428-431].

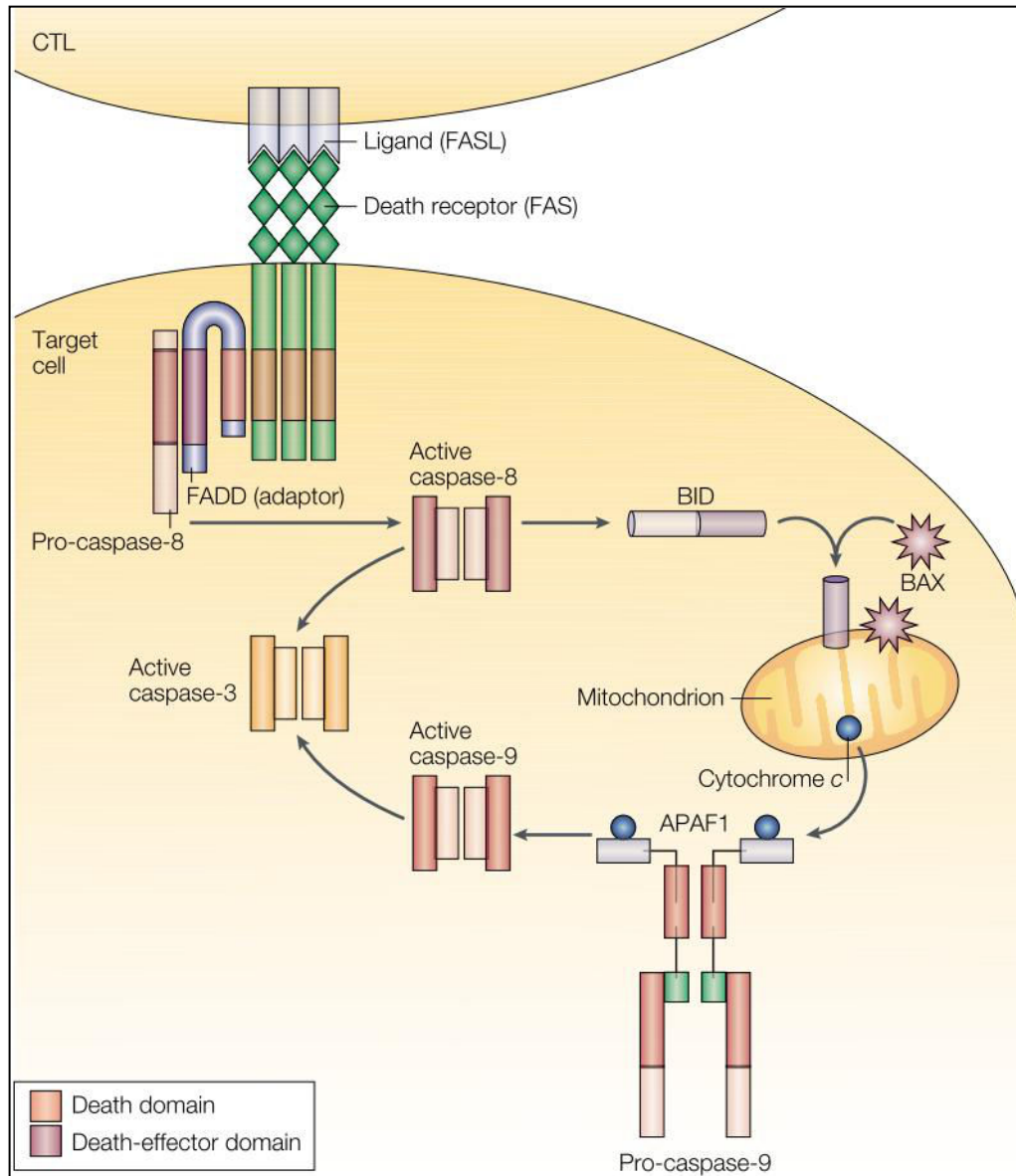
Les principales caractéristiques phénotypiques des LT CD8<sup>+</sup> naïfs, effecteurs et mémoires sont résumées dans le tableau 3.

**Tableau 3 : Caractéristiques phénotypiques des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>** (adapté de [425])

	LT CD8 <sup>+</sup> naïfs	LT CD8 <sup>+</sup> effecteurs	LT CD8 <sup>+</sup> effecteurs mémoires	LT CD8 <sup>+</sup> mémoires centraux
<i>CCR7</i>	+++	-	-	+
<i>CD27</i>	+++	-	+++	+++
<i>CD28</i>	High	Low	Low	High
<i>CD45RA</i>	+++	+	-	-
<i>CD45RO</i>	-	-	+++	+++
<i>CD62L</i>	+++	-	-	+++

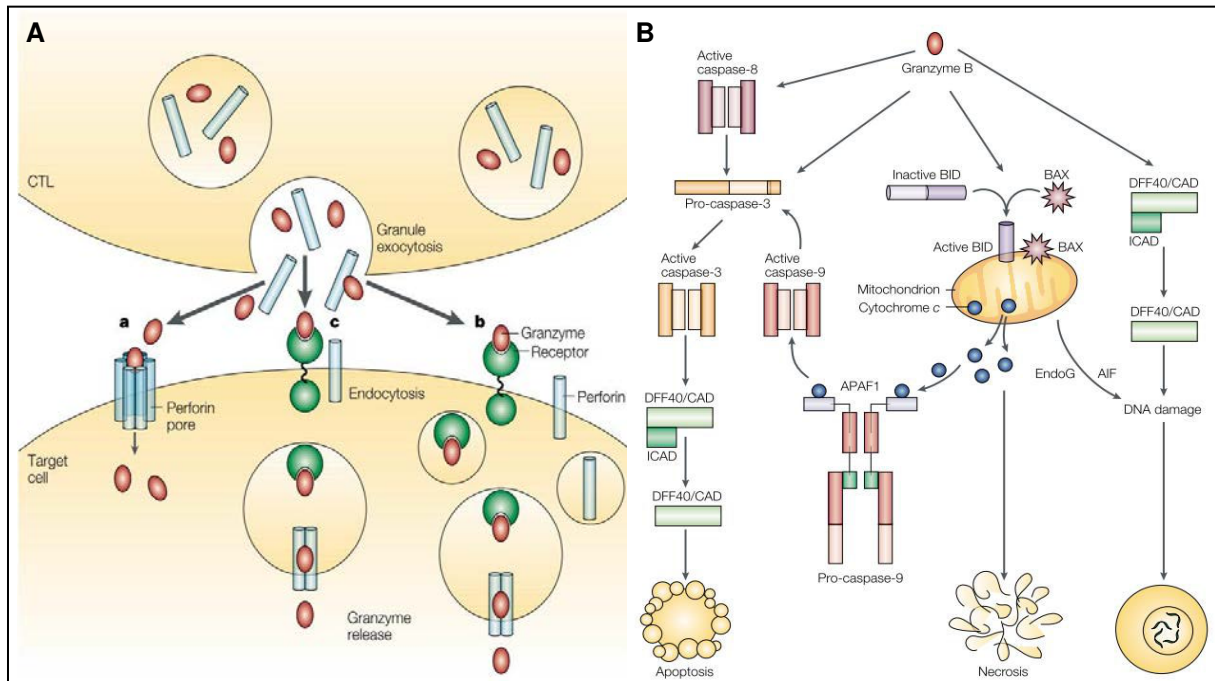
Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> effecteurs sont essentiellement caractérisés par leurs propriétés cytotoxiques. Physiologiquement, ils sont surtout impliqués dans les réponses immunitaires anti-infectieuse et anti-tumorale. Via leur TCR, ils reconnaissent un antigène peptidique présenté au sein du CMH-I qui, à l'inverse du CMH-II, est exprimé par toutes les cellules nucléées non germinales de l'organisme. Grâce à la sélection négative, les LT CD8<sup>+</sup> gagnant la périphérie ne devraient pas être activés par des auto-antigènes : c'est le concept de tolérance centrale. Cependant, la sélection négative n'est pas un processus infaillible et certains LT CD8<sup>+</sup> auto-réactifs gagnent la périphérie et sont impliqués dans les phénomènes d'auto-immunité [432]. Comme pour les LT CD4<sup>+</sup>, l'activation des LT CD8<sup>+</sup> implique, outre la liaison TCR/peptide-CMH-I, une interaction entre les molécules de costimulation CD28/CD80 [433]. Une fois stimulé, le LT CD8<sup>+</sup> pourra détruire sa

cellule cible par divers moyens. Les principales protéines impliquées dans la mort des cellules cibles sont le système perforine/granzyme et les ligands des récepteurs de mort : Fas Ligand (FasL), TNF- $\alpha$  et TRAIL (*Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand*) [434]. Ces protéines entraînent l'apoptose (granzyme, FasL, TNF- $\alpha$  et TRAIL) ou la nécrose (perforine) de la cellule cible [433]. Les récepteurs de mort membranaire se lient à leur ligand respectif (FasL/Fas, TNF- $\alpha$ /TNFR, TRAIL/TRAILR), ce qui entraîne l'activation de l'apoptose (Figure 10).



**Figure 10 : Apoptose déclenchée par la liaison FasL/Fas** (d'après Barry *et al* [434]). La stimulation du récepteur de mort Fas par son ligand (FasL) entraîne l'activation de la caspase-8 via une interaction avec la protéine adaptatrice FADD (*Fas-associated death domain protein*). La caspase-8 induit alors une activation directe (cellules de type I) ou indirecte (via la libération de cytochrome c et l'activation de la caspase-9) de la caspase-3, ce qui conduit à l'apoptose de la cellule cible.

La libération de perforine contenue dans les vésicules cytoplasmiques participe à l'action du granzyme B, par un mécanisme incomplètement élucidé (formation de pores membranaires ou libération du granzyme B contenu dans les vésicules endosomales au sein de la cellule cible). *In fine*, le granzyme B activera la voie apoptotique intrinsèque via BID (*BH3 Interacting-domain death agonist*) et également la voie extrinsèque via la caspase 3 (Figure 11) [434].



**Figure 11 : Pénétration (A) et mécanisme d'action (B) du granzyme B au sein de la cellule cible** (d'après Barry *et al* [434]).

(A) Lors de son interaction avec sa cible, le LT cytotoxique libère le contenu des granules d'exocytose dans l'espace intercellulaire et notamment granzyme et perforine. Initialement, on considérait que la perforine se polymérisait pour former un canal dans la membrane plasmique de la cellule cible et permettre la pénétration du granzyme dans le cytoplasme de la cellule cible (a). Plus récemment, a été mis en évidence un récepteur du granzyme B permettant l'endocytose directe du granzyme B dans le cytosol de la cellule cible. La perforine intervient alors dans la libération du granzyme B depuis les vésicules d'endocytose, directement dans la cellule cible (b). Enfin, le granzyme B pourrait lier son récepteur à la surface de la cellule et constituer directement une vésicule d'endocytose contenant de la perforine (c). (B) Une fois libéré dans le cytosol de la cellule cible, le granzyme B va induire l'apoptose par différentes voies. Il peut induire directement, ou via l'activation de la caspase-8, le clivage de la pro-caspase-3. De plus, le granzyme B peut induire le clivage de BID (*BH3 Interacting-domain death agonist*) et la libération de cytochrome c de la mitochondrie activant ainsi la caspase-9 puis la caspase-3. La libération de cytochrome c peut aussi induire la mort cellulaire par nécrose et libérer d'autres facteurs pro-apoptotiques tels que AIF (*apoptosis-inducing factor*) et l'endonucléase G (EndoG). Enfin, granzyme B est capable d'induire la dégradation de ICAD (*inhibitor of CAD*) et donc la constitution de dommages sur l'ADN via l'action du système DFF40/CAD (*DNA fragmentation 40/ caspase-activated deoxynuclease*).

Même si les LT CD8<sup>+</sup> effecteurs sont souvent caractérisés par leurs propriétés cytotoxiques, ils sont également dotés de propriétés immunomodulatrices car ils produisent des cytokines. Comme pour les LT CD4<sup>+</sup> auxiliaires, différentes sous-populations de LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (Tc) sont identifiées en fonction de leur profil cytokinique : les lymphocytes Tc1 produisent de l'IFN-γ mais pas d'IL-4 ou d'IL-5 alors que les lymphocytes Tc2 produisent de l'IL-4 et de l'IL-5 mais pas d'IFN-γ [435]. Même si leur rôle est moins bien connu que pour les LT CD4<sup>+</sup>, ces différentes sous-populations de LT CD8<sup>+</sup> sont pro-inflammatoires et jouent un rôle auxiliaire puisque les Tc1 et les Tc2 amplifient respectivement les réponses Th1 et Th2 [436].

De plus, et par analogie avec les LT CD4<sup>+</sup>, ont récemment été identifiés les lymphocytes Tc17 qui sont caractérisés par leur capacité à produire de l'IL-17. Les lymphocytes Tc17 se différencient à partir des mêmes précurseurs que les Tc1 et les Tc2 [437]. Ils sont pro-inflammatoires et typiquement dépourvus d'activité cytotoxique car ils produisent peu ou pas de granzyme B et de perforine. Certains lymphocytes Tc17 produisent aussi de l'IFN-γ [438]. Les lymphocytes Tc17 semblent impliqués dans la physiopathologie du lupus [439] et de la thrombopénie auto-immune [440] ; de plus, ils interviennent dans la réponse immunitaire anti-infectieuse [441,442].

Il existe aussi une sous-population de LT CD8<sup>+</sup> suppresseurs qui exerce une action régulatrice, notamment via la production d'IL-10 et de TGF-β [443]. L'existence de LT CD8<sup>+</sup> régulateurs (CD8<sup>+</sup> Treg) est en fait connue depuis les années 70 mais leur étude n'a été approfondie que récemment [307,444]. Leurs fonctions suppressives sont variables et quatre mécanismes différents interviennent :

- Une inhibition dépendante du contact impliquant CTLA-4 et TGF-β.
- La sécrétion de cytokines et chémokines anti-inflammatoires : IL-10, TGF-β, IL-16 et CCL4.
- L'induction de DC tolérogènes par une expression diminuée des molécules de costimulation CD86 et CD80 et par l'expression membranaire d'ILT3 (*Immunoglobulin-like Transcript 3*) et d'ILT4, récepteurs de la superfamille des immunoglobulines dont les domaines intracytoplasmiques comportent des domaines ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*).
- La lyse des LT CD4<sup>+</sup> effecteurs exprimant HLA-E.

Comme pour les Treg ( $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ ), on distingue les  $CD8^+$  Treg constitutifs des  $CD8^+$  Treg induits. Les  $CD8^+$  Treg constitutifs sont générés au niveau thymique et constituent une lignée spécifique. Ils partagent des marqueurs phénotypiques et un mode d'action proche de celui des Treg. Ils sont définis par le phénotype  $CD8^+CD25^+FoxP3^+CTLA-4^+GITR^+$  et exercent leur action suppressive par un mécanisme dépendant du contact impliquant CTLA-4 et TGF- $\beta$ . Comme pour les Treg, il n'existe pas de marqueur spécifique puisque les LT  $CD8^+$  effecteurs expriment aussi CD25 et CTLA-4 après activation, ainsi que FoxP3, au moins de façon transitoire [307,444].

Chez l'homme, une autre sous population de  $CD8^+$  Treg constitutifs a été identifiée par le phénotype  $CD8^+CXCR3^+$ . Leur action suppressive s'exerce via la sécrétion d'IL-10 et l'inhibition de la sécrétion d'IFN- $\gamma$ . Cette population présente des caractéristiques similaires aux  $CD8^+$  Treg murins  $CD8^+CD122^+$  [307,425,444].

De nombreuses autres populations de  $CD8^+$  Treg induits ont été décrites. Ils sont obtenus à partir de LT  $CD8^+$  périphériques sous l'action de diverses stimulations. Certains nécessitent une stimulation via leur TCR ( $CD8^+$  Treg spécifiques d'antigène), tandis que ce signal n'est pas nécessaire pour d'autres ( $CD8^+$  Treg non spécifiques d'antigène).

Les  $CD8^+$  Treg induits non spécifiques d'antigène sont obtenus à partir de cellules mononucléées sanguines stimulées par GM-CSF, IL-10 et IL-2 en présence de monocytes. Ils sont caractérisés par le phénotype  $CD8^+CD28^-FoxP3^-CD56^-$ . Ils inhibent la présentation antigénique des CPA, la prolifération des LT  $CD4^+$  et la cytotoxicité des LT  $CD8^+$  via la sécrétion d'IL-10. Cette population pourrait avoir un intérêt clinique puisque leur durée de vie est de l'ordre d'un mois et qu'ils sont résistants à un traitement par corticoïdes [444].

Les  $CD8^+$  Treg spécifiques d'antigène sont constitués d'une multitude de populations cellulaires, obtenues par des stimulations diverses et agissant soit de façon dépendante du contact soit via la sécrétion de cytokines [307,444]. Les données de la littérature suggèrent que les  $CD8^+$  Treg peuvent être induits à partir de cytokines, d'une stimulation de leur TCR ou en présence de CPA stimulées via leur TLR. Malheureusement, dans les différentes études, l'ensemble des marqueurs

phénotypiques n'a pas été étudié et il est donc probable que certaines populations soient redondantes avec d'autres. Par ailleurs, leur étude est à l'heure actuelle complexe en l'absence de marqueurs phénotypiques spécifiques permettant de les identifier et de les isoler.

Les CD8<sup>+</sup> Treg jouent un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire au cours de plusieurs modèles murins de maladies auto-immunes (PR, lupus érythémateux systémique, SEP, diabète de type I, colites inflammatoires, myasthénie) en modulant l'activité des CPA (DC et macrophages) et en diminuant la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> [307,444]. Chez l'Homme, les données sont peu nombreuses et les CD8<sup>+</sup> Treg semblent être impliqués au cours du lupus érythémateux systémique, du diabète de type I et de la SEP [307]. A l'inverse, les CD8<sup>+</sup> Treg, en infiltrant certaines tumeurs, sont pathogènes car ils participent à l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale [307].

### ***Rôle des LT CD8<sup>+</sup> au cours des pathologies auto-immunes***

Le rôle des LT CD8<sup>+</sup> au cours des maladies dysimmunitaires est moins bien connu que celui des LT CD4<sup>+</sup> mais un certain nombre de données démontre leur implication dans la physiopathologie de la PR [425], de la SEP [445], du diabète de type I [446], du vitiligo [447] et de la thrombopénie immunologique [448-451]. Notre équipe a montré au cours de la thrombopénie immunologique que l'échec d'un traitement par anti-CD20 (rituximab) était associé à une augmentation des réponses Th1 et T CD8 spléniques. De plus, il existait une restriction oligoclonale du répertoire des LT CD8<sup>+</sup> spléniques chez les patients résistant au rituximab, témoignant d'un processus d'activation clonale des LT CD8<sup>+</sup> [452].

Au cours de la SEP, davantage de LT CD8<sup>+</sup> que de LT CD4<sup>+</sup> infiltrent le tissu cérébral. Ces LT CD8<sup>+</sup> prolifèrent *in situ* [453] et leur expansion clonale a également été montrée dans le sang circulant et le liquide céphalo-rachidien des patients [454]. Au cours de la SEP, les LT CD8<sup>+</sup> pourraient s'accumuler en raison d'une résistance à l'apoptose induite par Fas [455]. Les données disponibles dans la littérature sont contradictoires concernant l'implication des LT CD8<sup>+</sup> dans l'encéphalite auto-immune extrinsèque, principal modèle murin utilisé pour l'étude de la SEP. En effet, la

mortalité est diminuée chez les souris déficientes en LT CD8<sup>+</sup> mais celles-ci présentent plus de rechutes [425,432].

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont également impliqués dans la pathogénie de la PR [425,432]. Ils semblent avoir un impact sur l'initiation et la progression de la maladie dans plusieurs modèles murins de PR [425,432]. L'élimination des LT CD8<sup>+</sup> a un impact variable sur la progression de la maladie en fonction du modèle étudié et du stade de la maladie [425,432]. En fait, ces études sont très difficiles à interpréter car aucune n'a analysé l'implication précise de chaque sous-population de LT CD8<sup>+</sup> dans la survenue de la maladie. A chaque fois, la totalité des LT CD8<sup>+</sup> était éliminée. Il est donc possible que la discordance des résultats d'une étude à l'autre ne soit pas liée au modèle lui-même mais au fait que la déplétion ait porté sur l'ensemble des LT CD8<sup>+</sup>, ces derniers comprenant différentes sous-populations fonctionnellement hétérogènes [425].

Chez l'Homme, plusieurs études ont montré de façon indirecte l'implication des LT CD8<sup>+</sup> dans la physiopathologie de la PR [425]. Dans le sang circulant de patients atteints de PR et comparativement à des sujets sains, une augmentation du pourcentage de LT CD8<sup>+</sup> mémoires centraux (CD62L<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>) et une diminution des LT CD8<sup>+</sup> effecteurs mémoires (CD62L<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>) a été rapportée [456]. De plus, le taux de facteur rhumatoïde semble corrélé au pourcentage de LT CD8<sup>+</sup> mémoires centraux [456]. Dans le liquide synovial de patients atteints de PR, les LT CD8<sup>+</sup> représentent environ 40% des LT totaux et leur répertoire est oligoclonal, ce qui signifie qu'ils prolifèrent au niveau articulaire [457-459]. De plus, comparativement aux LT CD8<sup>+</sup> sanguins, les LT CD8<sup>+</sup> synoviaux expriment davantage les marqueurs d'activation CD25 et CD69 [460]. L'étude du répertoire des LT CD8<sup>+</sup> infiltrant la synoviale de patients atteints de PR a permis de mettre en évidence une restriction d'hétérogénéité du TCR et surtout l'existence de séquences identiques d'un patient à l'autre, ce qui permet d'émettre l'hypothèse que la PR est une maladie auto-immune liée à une réponse immunitaire T dirigée contre un auto-antigène commun [425,457,458]. Cependant, d'autres auteurs pensent que les antigènes stimulant la réponse immunitaire T CD8 articulaire au cours de la PR ne sont pas liés à la maladie elle-même mais plutôt un épiphénomène d'origine virale. En effet, les TCR de ces LT CD8<sup>+</sup> reconnaissent différents antigènes viraux issus de l'*Ebstein-Barr virus* (EBV), du cytomégalovirus (CMV) et du virus de la grippe [461,462]. Ces LT



CD8<sup>+</sup>, bien que spécifiques des virus, expriment beaucoup de marqueurs d'activation et produisent beaucoup de cytokines pro-inflammatoires (notamment de l'IFN- $\gamma$ ). Ils pourraient ainsi contribuer à entretenir la réponse inflammatoire locale [463]. Cependant, le fait qu'il n'existe pas de corrélation entre la sévérité de la maladie et le niveau de réponse CD8 anti-EBV va à l'encontre d'une réelle implication de ces LT CD8<sup>+</sup> anti-EBV dans la physiopathologie de la PR [464].

Au cours de la PR, la présence de centres germinatifs ectopiques au sein de la membrane synoviale est impliquée dans la production de cytokines, d'auto-anticorps et de facteurs rhumatoïdes ; de plus, la présence de ces structures est associée à une maladie de moins bon pronostic [465]. Or, les LT CD8<sup>+</sup> jouent un rôle dans la formation de centres germinatifs ectopiques au sein de la membrane synoviale car lorsque des souris NOD-SCID sont greffées avec des membranes synoviales contenant des centres germinatifs, un traitement éliminant les LT CD8<sup>+</sup> grâce à un anticorps anti-CD8 provoque une destruction des follicules secondaires et une diminution significative de la production locale de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$  [465,466].

En résumé, il existe dans la littérature des arguments en faveur d'un rôle physiopathologique des LT CD8<sup>+</sup> au cours de maladies dysimmunitaires, soit via une activité cytotoxique excessive ou auto-réactive, soit via un défaut quantitatif ou fonctionnel en CD8<sup>+</sup> Treg [425,432]. En revanche, très peu de données sont disponibles concernant leur rôle au cours de l'ACG. Des études ont mis en évidence une diminution du nombre de LT CD8<sup>+</sup> circulants au cours de l'ACG et la PPR [467-472], y compris au cours de l'ACG à VS normale [473]. La diminution du pourcentage de LT CD8<sup>+</sup> circulants au cours de l'ACG semble par ailleurs corrélée à l'existence d'une sténose carotidienne [474]. De plus, une corrélation a été mise en évidence entre la diminution du pourcentage de LT CD8<sup>+</sup> circulants après 6 mois de traitement par corticoïdes et le risque de survenue d'ACG ou PPR sévère, c'est-à-dire rechutant et/ou nécessitant une durée de traitement plus longue [475]. Enfin, une augmentation des lymphocytes Tc1 (CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) dans le sang circulant de patients atteints d'ACG a plus récemment été mise en évidence [84].

Comme nous l'avons déjà évoqué, les mécanismes impliqués dans la pathogénie de l'ACG font intervenir les lymphocytes Th1 et Th17, les monocytes et les macrophages [19,137,138,147,148]. Ceci s'accompagne d'une forte production de cytokines pro-inflammatoires et notamment d'IFN- $\gamma$ , une cytokine impliquée dans l'activation et la différenciation des LT CD8<sup>+</sup> [425].

C'est pour ces raisons que nous pensons que les LT CD8<sup>+</sup> peuvent jouer un rôle dans la physiopathologie de l'ACG et que nous avons étudié leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles au cours de cette pathologie.

## **2. Etude des LT CD8<sup>+</sup> au cours de l'ACG : résultats préliminaires**

### **Matériels et Méthodes**

Trente patients atteints d'ACG (n = 23) ou de PPR (n = 7) ont été inclus dans cette étude et comparés à 21 sujets sains appariés pour l'âge et le sexe. Les patients étaient prélevés avant que la corticothérapie ait débuté (maladie active) et après 3 mois de traitement (maladie en rémission).

Les cellules mononucléées sanguines (PBMC) ont été isolées par gradient de centrifugation en milieu de séparation de lymphocytes puis analysées par cytométrie en flux pour déterminer les pourcentages circulants de LT cytotoxiques (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Perforine<sup>+</sup>GranzymeB<sup>+</sup>), lymphocytes Tc1 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) et Tc17 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>), ainsi que l'expression des principaux récepteurs de chémokines (CCR5, CCR6, CCR7 et CXCR3), du CD62L, du marqueur d'activation HLA-DR et du marqueur de dégranulation CD63.

Les concentrations sériques de granzyme A, granzyme B, CCL2, CCL20, CXCL9, CXCL10 et CXCL11 ont été mesurées par ELISA (granzymes A et B) ou méthode Luminex<sup>®</sup> (eBioscience).

Cinq BAT ont été étudiées par immunohistochimie. Les marquages ont été réalisés à partir de blocs fixés dans le formol et inclus en paraffine. Les immunomarquages ont été effectués sur l'automate Benchmark Ultra (Ventana, Ilkirch) qui réalise, dans des conditions techniques parfaitement maîtrisées, le déparaffinage des coupes dans des bains de xylène, leur réhydratation dans des

bains d'alcool de concentration décroissante, le démasquage antigénique par la chaleur, l'inhibition des peroxydases endogènes dans une solution d'eau oxygénée, l'incubation avec les anticorps primaires puis secondaires et enfin le dépôt d'un substrat de l'enzyme couplé à l'anticorps secondaire, la Diaminobenzidine qui donne un précipité brun visible au microscope. Une contre-coloration nucléaire avec l'hématoxyline a ensuite été effectuée avant le montage avec une lamelle. Les anticorps suivants ont été utilisés : anti-CD3 (Thermoscientific, clone SP7, 1/50), anti-CD4 (Ventana Roche, clone SP5, 1/30), anti-CD8 (Dako, clone CD8/144B, 1/100).

L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel Graph Pad PRISM® Software v5.02. Les variables quantitatives indépendantes (entre patients et sujets contrôles) ont été comparées par un test non paramétrique de Mann Whitney. Les variables quantitatives appariées (comparaison des patients avant et après 3 mois de traitement) ont été comparées par un test non paramétrique de Wilcoxon. Lorsque plus de 3 séries de données étaient comparées, un test de Kruskal-Wallis pour les variables indépendantes et un test de Friedman pour les variables appariées ont été réalisés. Le seuil de significativité a été fixé à 0,05.

## **Résultats**

### ***Population étudiée***

Les principales caractéristiques des patients inclus dans cette étude sont résumées dans le tableau 4. Parmi les 23 patients atteints d'ACG, tous présentaient au moins 3 des 5 critères de l'ACR [31]. Une BAT a été réalisée dans 21/23 cas, mettant en évidence des lésions de vascularite dans 14/21 (67%) cas. Parmi les 9 patients n'ayant pas eu de BAT ou une BAT négative, 1 patient présentait un signe du halo à l'écho-Doppler des artères temporales, 2 patients un AVC postérieur en rapport avec une occlusion de l'artère vertébrale, 1 patient une NOIAA, et 3 patients une aortite révélée par l'angioscanner aortique.

La VS, la CRP et le fibrinogène étaient significativement augmentés chez les patients par rapport aux témoins. A l'inverse, l'hémoglobine était diminuée chez les patients. L'âge, le nombre de lymphocytes et les pourcentages de LT totaux, de LT CD4<sup>+</sup> et de LT CD8<sup>+</sup> n'étaient pas significativement différents entre les groupes. Par conséquent, dans la suite de cette étude, nous présenterons les résultats sous forme

de pourcentages de LT CD8<sup>+</sup> totaux plutôt que sous forme de valeur absolue par mm<sup>3</sup> (tableau 4).

Enfin, en dehors du fibrinogène qui était plus élevé au cours de l'ACG, les principaux paramètres biologiques n'étaient pas différents entre les patients atteints de PPR et d'ACG (tableau 4).

**Tableau 4 : Caractéristiques des patients et des sujets sains à l'inclusion**

	Patients		Témoins (n=21)	<i>P value</i>	
	ACG (n=23)	PPR (n=7)		ACG vs PPR	Patients vs Témoins
<b>Age (années), moyenne ± SEM [range]</b>	75,2 ± 1,9 [59-90]	77,6 ± 1,9 [68-83]	71,1 ± 12,7 [51-91]	0,75	0,213
<b>Sexe ratio (F/H)</b>	15/8	3/4	12/9	-	-
<b>Manifestations cliniques, n (%)</b>			-	-	-
Signes généraux	16 (70)	5 (71)	-	-	-
Céphalées	20 (87)	2 (29)	-	-	-
Claudication de la mâchoire	8 (35)	0	-	-	-
Hyperesthésie du cuir chevelu	9 (39)	0	-	-	-
Pouls temporal diminué ou aboli	4 (17)	0	-	-	-
Amaurose	1 (4)	0	-	-	-
Diplopie	1 (4)	0	-	-	-
NOIAA	1 (4)	0	-	-	-
Arthralgies	4 (17)	4 (57)	-	-	-
PPR	12 (52)	7 (100)	-	-	-
AVC	2 (9)	0	-	-	-
<b>Examen complémentaires</b>					
Aortite	5/8	-	-	-	-
Halo au Doppler des AT	1/2	-	-	-	-
Hémoglobine (g/dL)	11,0 ± 0,4	10,9 ± 0,6	13,6 ± 0,3	0,961	<0,0001
Leucocytes (/mm <sup>3</sup> )	8930 ± 527	8086 ± 1512	5909 ± 361	0,641	<0,0001
Lymphocytes (/mm <sup>3</sup> )	1490 ± 92	1848 ± 734	1698 ± 152	0,315	0,247
CD3 (%)	72 ± 2,0	79 ± 5,2	72 ± 1,5	0,184	0,306
CD4 (%)	54 ± 2,4	50 ± 6,4	51 ± 2,4	0,589	0,427
CD8 (%)	17 ± 1,4	26 ± 8,3	19 ± 1,7	0,589	0,84
VS (mm/heure)	83,8 ± 6,9	83,0 ± 8,4	16,9 ± 2,5	0,799	<0,0001
CRP (mg/L)	74,9 ± 7,5	66,6 ± 7,3	3,0 ± 0,1	0,667	<0,0001
Fibrinogène (g/L)	7,0 ± 0,3	5,6 ± 0,2	3,3 ± 0,1	<b>0,006</b>	<0,0001
BAT positive	14/21 (61)	0/5 (0)	-	-	-

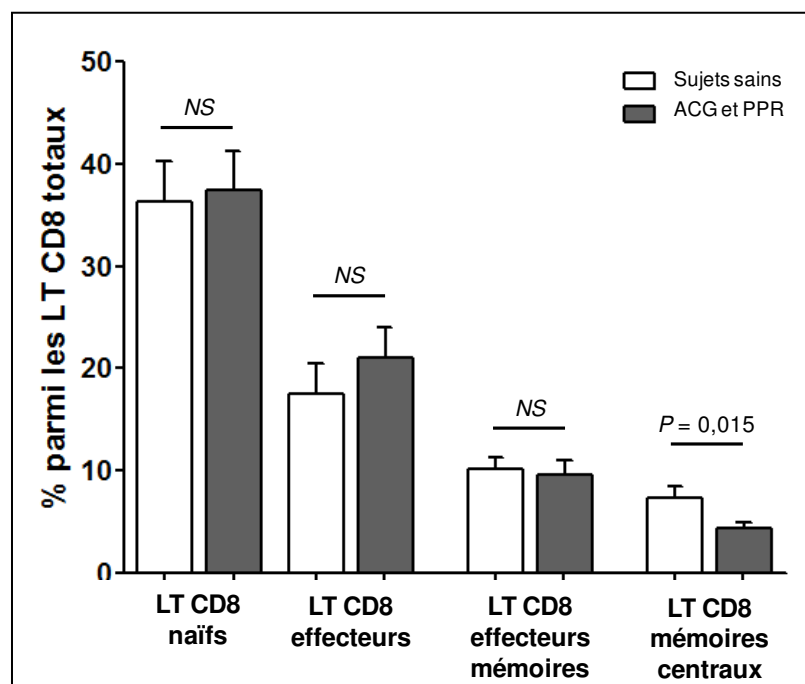
**ACG** : artérite à cellules géantes ; **AT** : artère temporale ; **AVC** : accident vasculaire cérébral ; **BAT** : biopsie d'artère temporale ; **CRP** : C-réactive protéine ; **NOIAA** : névrite optique ischémique antérieure aiguë ; **PPR** : pseudopolyarthrite rhizomélitique ; **SEM** : *standard error of the mean* ; **VS** : vitesse de sédimentation.

Présentation des valeurs : moyenne ± SEM (variables quantitatives) ou n (%) (variables qualitatives).

### Caractéristiques phénotypiques des LT CD8<sup>+</sup>

Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les patients et les sujets sains concernant les pourcentages sanguins de LT CD8<sup>+</sup> naïfs (CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>) et effecteurs mémoires (CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup> CD62L<sup>-</sup>) (Figure 12). En revanche, le pourcentage de LT CD8<sup>+</sup> mémoires centraux (CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>) était diminué chez les patients ( $4,3 \pm 0,6$  vs  $7,4 \pm 1,0$  ;  $P = 0,015$ ). Cette diminution était compensée par une augmentation du pourcentage de LT CD8<sup>+</sup> effecteurs (CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> CD62L<sup>-</sup>) chez les patients mais sans atteindre le seuil de significativité ( $21 \pm 2,9$  vs  $17,5 \pm 3,0$  ;  $P = 0,41$ ) (Figure 12).

L'expression de HLA-DR parmi les LT CD8<sup>+</sup> avait tendance à être augmentée chez les patients par rapport aux témoins mais sans atteindre le seuil de significativité ( $27,0 \pm 2,8$  vs  $23,5 \pm 2,8$  ;  $P = 0,535$ ).



**Figure 12 :** Analyse par cytométrie en flux du phénotype des LT CD8<sup>+</sup> circulants chez 30 patients (23 ACG et 7 PPR) et 21 sujets sains appariés pour l'âge.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de LT CD8<sup>+</sup> totaux : LT CD8<sup>+</sup> naïfs (CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>), effecteurs (CD45RA<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> CD62L<sup>-</sup>), effecteurs mémoires (CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup> CD62L<sup>-</sup>) et mémoires centraux (CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>).

Les histogrammes représentent la moyenne et la barre d'erreur la SEM.

$P$  : test de Mann Whitney.

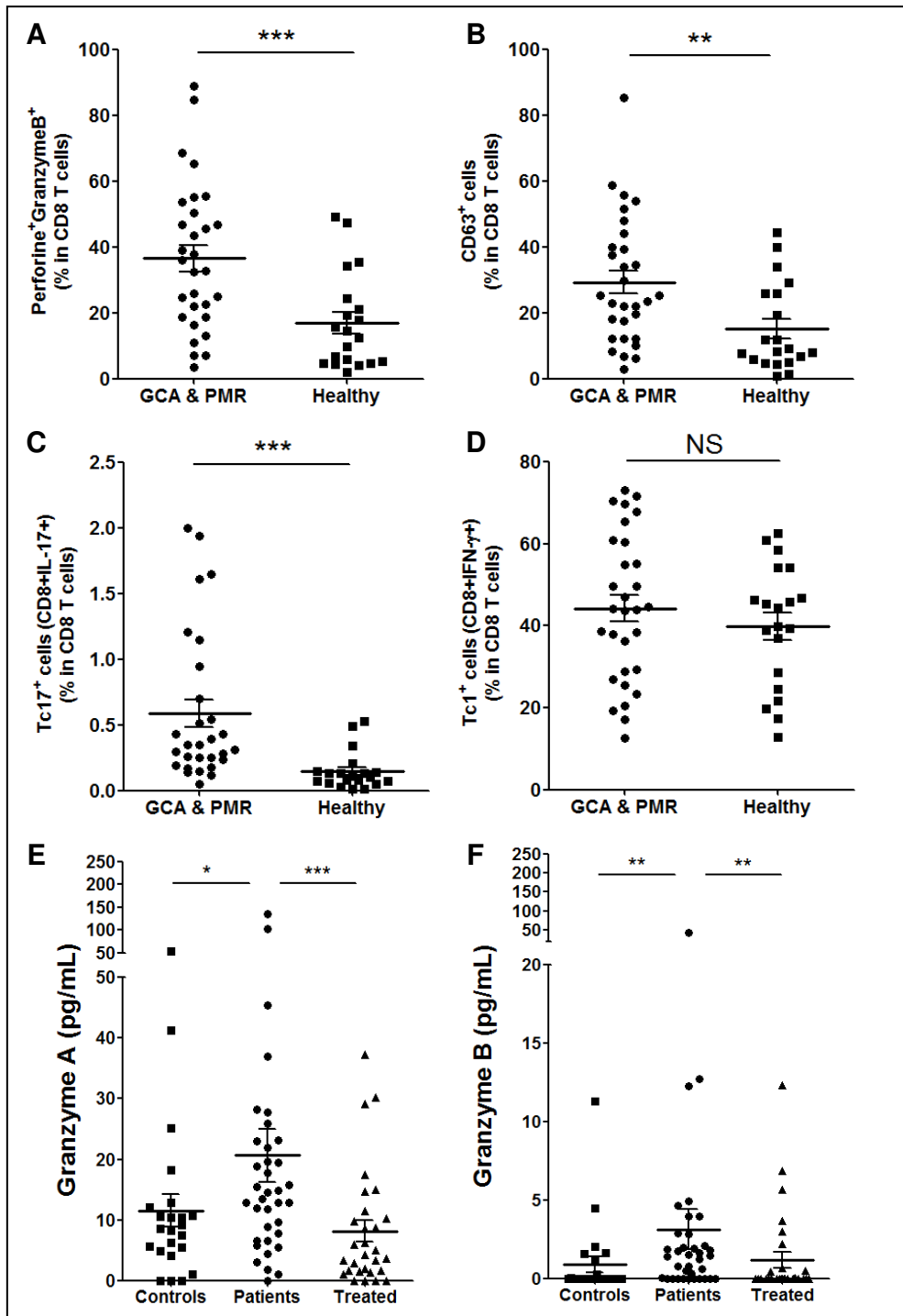
### La réponse T CD8 cytotoxique est augmentée au cours de l'ACG et la PPR

Le pourcentage de LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques circulants (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Perforine<sup>+</sup> GranzymeB<sup>+</sup>) était deux fois plus élevé chez les patients que chez les sujets sains ( $36,6 \pm 4,1$  vs  $16,3 \pm 3,1\%$  ;  $P = 0,0004$  ; Figure 13). De plus, l'expression de CD63, molécule exprimée sur la membrane plasmique des LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques une fois

qu'ils ont libéré le contenu de leurs granules, était augmentée chez les patients par rapport aux sujets sains ( $29,3 \pm 3,5$  vs  $14,8 \pm 2,9\%$ ;  $P = 0,003$  ; Figure 13).

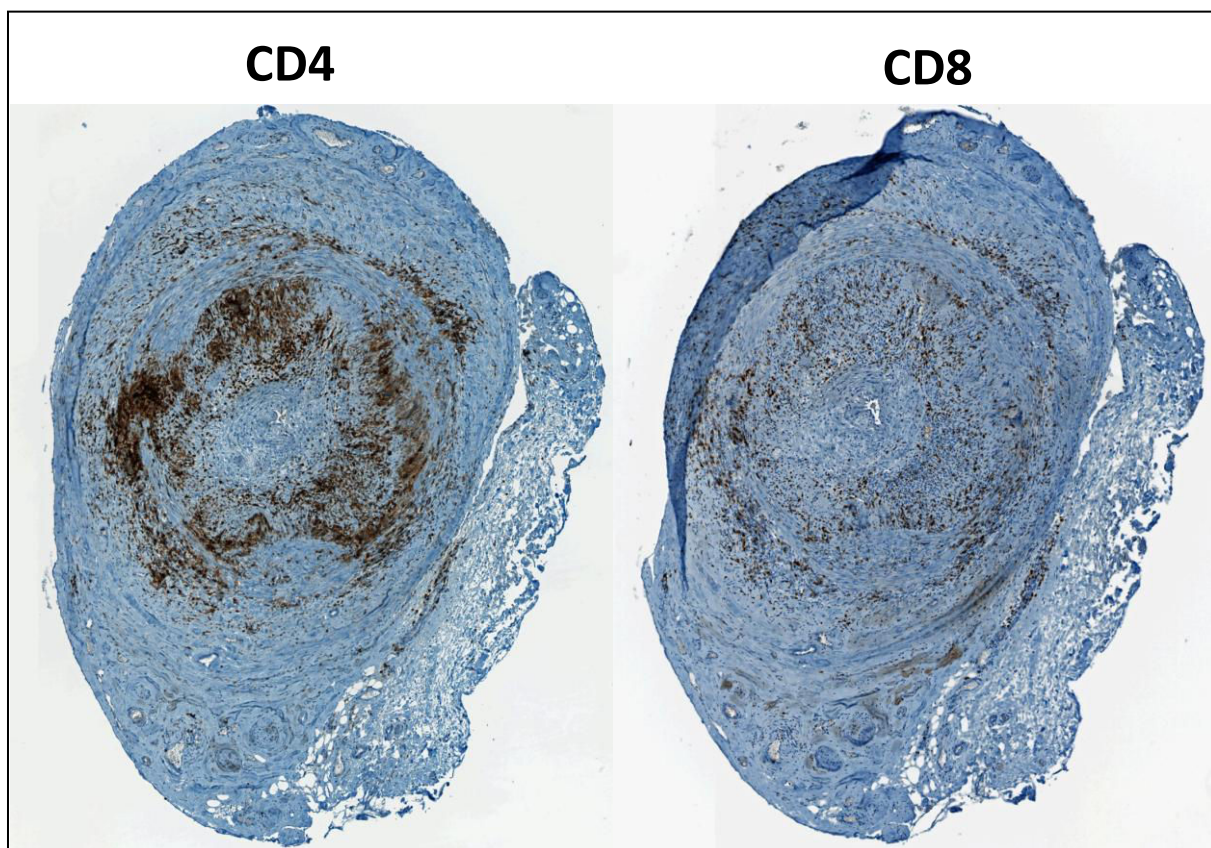
Le pourcentage de lymphocytes Tc1 ( $CD3^+CD8^+IFN-\gamma^+$ ) n'était pas différent entre patients et sujets sains. En revanche, celui des lymphocytes Tc17 ( $CD3^+CD8^+IL-17^+$ ) était augmenté chez les patients ( $0,59 \pm 0,11$  vs  $0,15 \pm 0,03\%$  ;  $P < 0,0001$  ; Figure 13).

Enfin, les concentrations sériques de Granzyme A et Granzyme B étaient plus élevées chez les patients ( $n = 36$ ), en comparaison aux sujets sains ( $n = 23$ ) : respectivement  $20,6 \pm 4,4$  vs  $11,6 \pm 2,7$  pg/mL ( $P = 0,02$ ) et  $3,2 \pm 1,3$  vs  $0,95 \pm 0,49$  pg/mL ( $P = 0,004$ ) (Figure 13).



**Figure 13 : Marqueurs de cytotoxicité et profil cytokinique des LT CD8<sup>+</sup> au cours de l'ACG et la PPR.** **A, B :** mesure du pourcentage de LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>GranzymeB<sup>+</sup>Perforine<sup>+</sup>) et de l'expression membranaire du CD63 parmi les LT CD8<sup>+</sup> totaux (n = 30 patients et 21 sujets sains). **C, D :** quantification des lymphocytes Tc1 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>IFN-γ<sup>+</sup>) et Tc17 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>) après stimulation par PMA et ionomycine en présence de Brefeldin-A pendant 4 heures (n = 30 patients et 21 sujets sains). **E, F :** mesure de la concentration sérique de Granzyme A et B par méthode ELISA (n = 36 patients non traités, 23 sujets sains et 29 patients traités). Les barres horizontales représentent les moyennes et les barres d'erreur la SEM. *P*<0,05 (\*) ; *P*<0,01 (\*\*) ; *P*< 0,001 (\*\*\*) (test de Mann Whitney).

L'analyse par immunohistochimie de l'infiltrat lymphocytaire T présent dans la paroi de 5 BAT issues de patients atteints d'ACG a révélé une infiltration massive par des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, avec un ratio CD4/CD8 d'environ 4/1 (Figure 14).



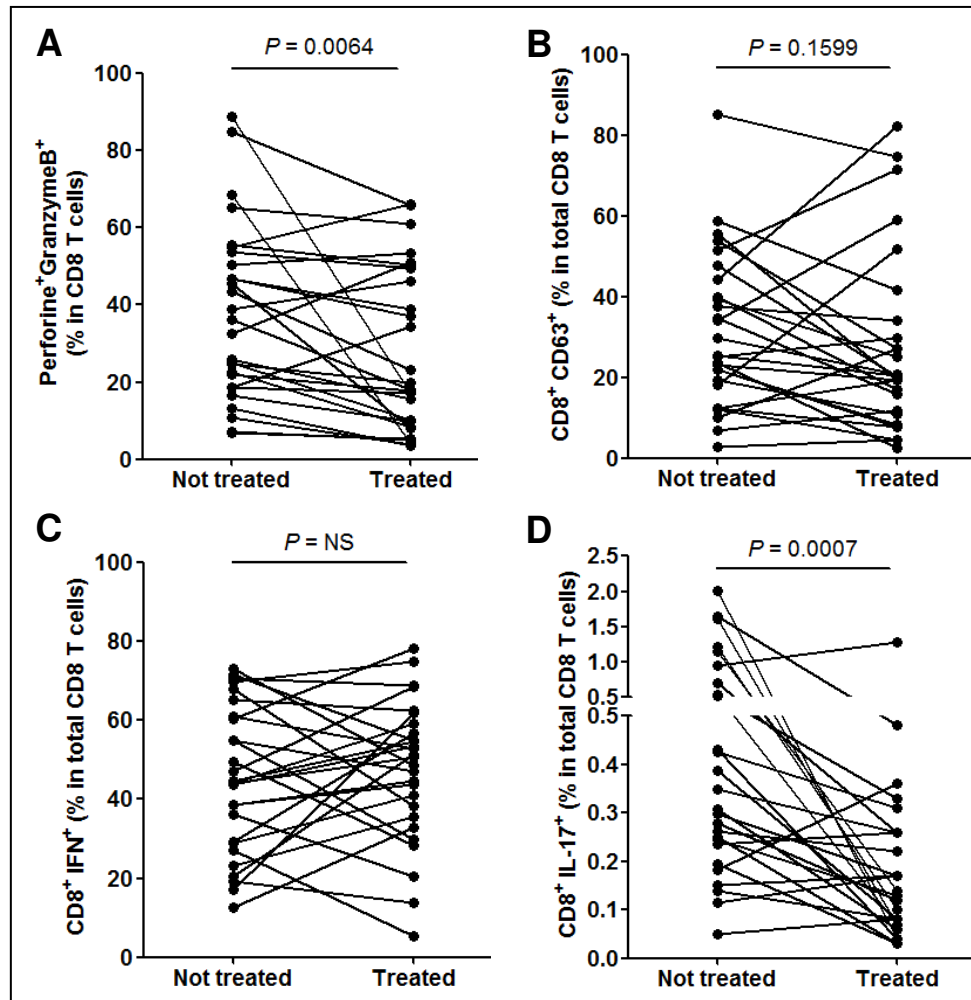
**Figure 14** : Etude par immunohistochimie de l'infiltrat en lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dans une biopsie d'artère temporale d'un patient atteint d'ACG. Les coupes d'artère temporale ont été réalisées au niveau de la même lésion et montrent le résultat d'un marquage par anticorps anti CD4 et CD8. Grossissement : x40.

### ***Effet de la corticothérapie sur la réponse lymphocytaire T CD8***

Vingt-sept des 30 patients inclus dans cette étude ont été revus après 3 mois de traitement. Tous les patients étaient en rémission clinique et biologique, avec en moyenne une CRP de  $6,7 \pm 0,9$  mg/L, une VS de  $26,3 \pm 2,7$  mm à la 1<sup>ère</sup> heure et un fibrinogène de  $3,9 \pm 0,2$  g/L. Au moment du second prélèvement, qui avait lieu 3 mois après le début du traitement, les patients recevaient en moyenne  $18,8 \pm 1,62$  mg/j d'équivalent prednisone et un traitement par méthotrexate était associé chez 2/27 (7%) patients.



Les pourcentages de lymphocytes T cytotoxiques ( $P=0,0064$ ), de lymphocytes Tc17 ( $P=0,0007$ ) et les concentrations sériques de granzyme A ( $P=0,0008$ ) et de granzyme B ( $P=0,0078$ ) avaient significativement diminué par rapport au diagnostic. Cependant, le pourcentage de lymphocytes Tc1 et l'expression de CD63 par les LT CD8<sup>+</sup> totaux n'étaient pas modifiés par la corticothérapie (Figure 13 et 15).

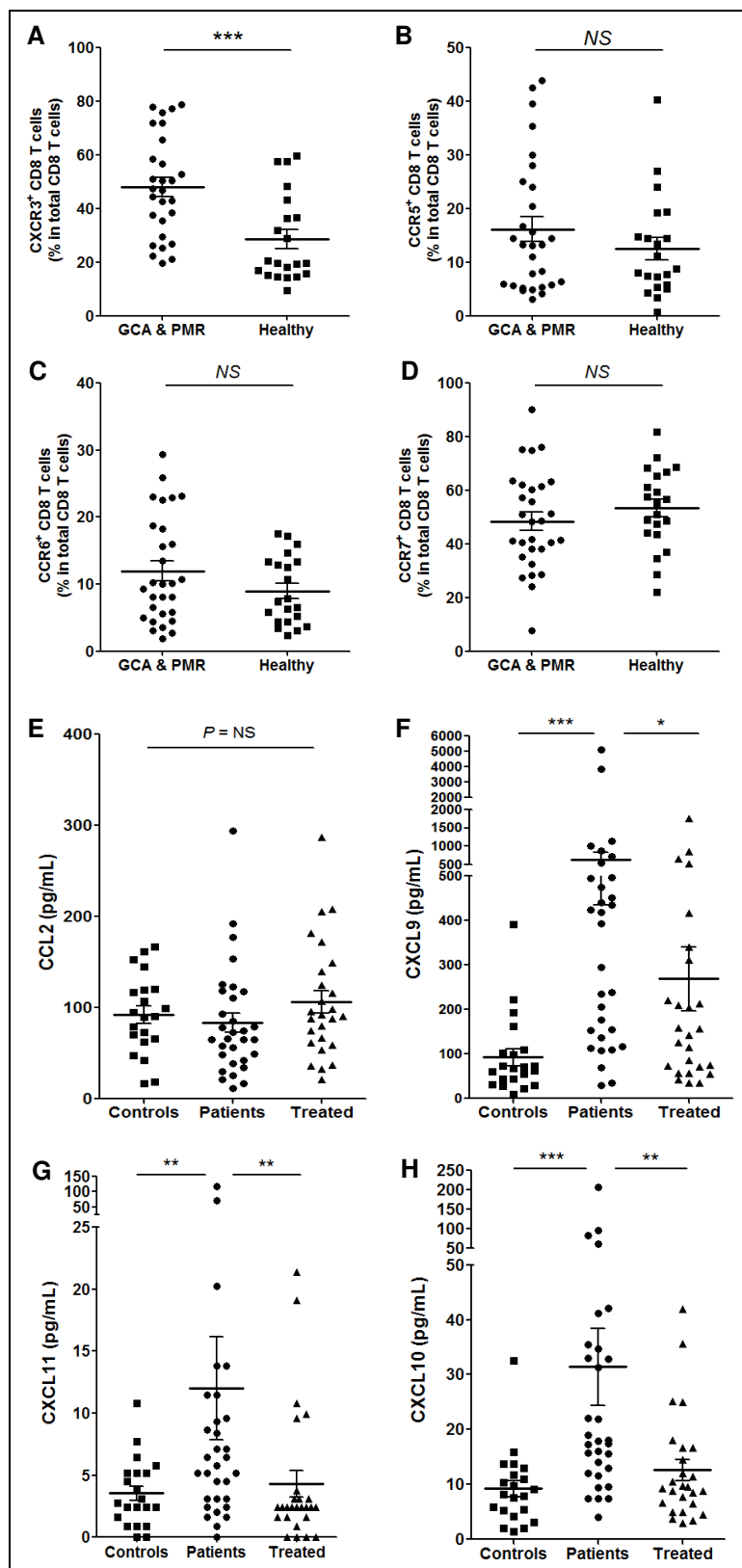


**Figure 15 : Effet de la corticothérapie sur la cytotoxicité et le profil cytokinique des LT CD8<sup>+</sup> circulants.** Mesure par cytométrie en flux du pourcentage de LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Perforine<sup>+</sup>Granzyme B<sup>+</sup>) (A), de l'expression membranaire du CD63 par les LT CD8<sup>+</sup> (B) et des pourcentages de lymphocytes Tc1 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) (C) et Tc17 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>) (D) chez 27 patients, avant et après 3 mois de traitement par corticoïdes (et méthotrexate pour 2 d'entre eux).  $P$  : test de Wilcoxon.

***Les LT CD8<sup>+</sup> infiltrent la paroi artérielle via l'interaction de CXCR3 avec ses ligands (CXCL9, -10, -11)***

L'expression de CCR5, CCR6 et CCR7 par les LT CD8<sup>+</sup> totaux n'était pas différente entre les patients et les témoins. En revanche, nous avons mis en évidence une augmentation significative de l'expression de CXCR3 par les LT CD8<sup>+</sup> circulants des patients, comparativement à ceux des sujets sains ( $48,1 \pm 3,6$  vs  $28,5 \pm 3,5\%$  ;  $P = 0,0004$  ; Figure 16).

Or, et alors que les taux sériques de CCL2 et CCL20 n'étaient pas différents entre patients et témoins, la concentration des ligands de CXCR3 était significativement plus élevée dans le sérum des patients par rapport aux sujets sains :  $629,8 \pm 194,7$  vs  $92,8 \pm 19,2$  pg/mL ( $P < 0,0001$ ) pour CXCL9 ;  $31,4 \pm 6,9$  vs  $9,2 \pm 1,5$  pg/mL ( $P < 0,0001$ ) pour CXCL10 et  $12,0 \pm 4,1$  vs  $3,5 \pm 2,7$  pg/mL ( $P = 0,0094$ ) pour CXCL11. De plus, la concentration sérique de ces 3 chémokines diminuait significativement après traitement par corticoïdes (Figure 16). Cependant, il n'existait pas de corrélation entre le pourcentage (ou le nombre) de LT CD8<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> circulants et les concentrations sériques de CXCL9, CXCL10 ou CXCL11.



**Figure 16 :** Expression des récepteurs de chimiokines par les LT CD8<sup>+</sup> et mesures des concentrations sériques de chimiokines au cours de l'ACG et la PPR.

**A-D :** mesure par cytométrie en flux du pourcentage de LT CD8<sup>+</sup> exprimant CXCR3 (A), CCR5 (B), CCR6 (C) et CCR7 (D) (30 patients et 21 sujets sains).

**E-F :** mesure par méthode Luminex<sup>®</sup> des concentrations sériques de CCL2 (E), CXCL9 (F), CXCL10 (H) et CXCL11 (G) (31 patients non traités, 26 patients traités, 21 sujets sains).

Les barres horizontales représentent les moyennes et les barres d'erreur la SEM.

$P < 0,05$  (\*) ;  $P < 0,01$  (\*\*) ;

$P < 0,001$  (\*\*\*) (test de Mann Whitney).

## **Conclusion et perspectives**

Ces résultats préliminaires sont en faveur d'une implication des LT CD8<sup>+</sup> dans la physiopathologie de l'ACG et de la PPR. En effet, chez les patients non traités chez qui la maladie est active, les LT CD8<sup>+</sup> infiltreront les lésions de vascularite et ont dans le sang un phénotype activé : forte expression de molécules cytotoxiques (granzyme B et perforine) et de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-17. De plus, les concentrations sériques de granzymes A et B sont élevées au diagnostic et diminuent significativement lorsque la maladie a été mise en rémission par la corticothérapie.

Comparativement aux sujets sains, nous avons aussi mis en évidence chez les patients une augmentation des LT CD8<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> circulants et des concentrations en ligands de CXCR3 (CXCL9, CXCL10 et CXCL11). L'interaction entre CXCR3 et ses ligands (CXCL9, -10 et -11) pourrait donc intervenir dans le recrutement des LT CD8<sup>+</sup> au sein de la paroi artérielle. Une fois dans la paroi vasculaire, les LT CD8<sup>+</sup> pourraient alors produire des molécules cytotoxiques et de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN-γ et l'IL-17 [425] qui, au cours de l'ACG, sont les deux principales cytokines impliquées dans l'activation des monocytes/macrophages, des cellules endothéliales et des CML, conduisant au remodelage de la paroi vasculaire et aux lésions caractéristiques de l'ACG [137,138,158].

Les chémokines de la famille CXC sont divisées en deux groupes. Les chémokines ELR (CXCL1 à 8) qui contiennent un motif ELR (acide glutamique-leucine-arginine) près de leur extrémité N terminale et les chémokines non ELR (CXCL9 à 11) qui n'en contiennent pas. Même s'il existe au cours de l'ACG une intense réponse Th1, aucune étude n'a pour l'instant mis en évidence d'implication de ces 3 chémokines non ELR dans la physiopathologie de l'ACG. En revanche, il est bien démontré que CXCL9, -10 et -11 sont produites par les cellules NK et les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> activés et que l'expression des gènes de ces 3 chémokines est induite par l'IFN-γ [476-478]. Sous l'influence de l'IFN-γ, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules thyroïdiennes, les pré-adipocytes peuvent également produire CXCL10 [476]. Ces chémokines sont impliquées dans la réponse immunitaire à médiation cellulaire et donc dans les défenses anti-infectieuses, le rejet de greffe et certaines maladies auto-immunes spécifiques d'organe (diabète de type

1, thyroïdites auto-immunes, myasthénie auto-immune) ou systémiques (PR, lupus érythémateux systémique, psoriasis, cryoglobulinémies, sclérodermie systémique et syndrome de Gougerot-Sjögren) [476-478]. Comme pour ses ligands, l'expression de CXCR3 sur les LT et les cellules NK est également inductible par l'IFN- $\gamma$  [479].

La corticothérapie, traitement de référence de l'ACG a induit une rémission clinique et biologique chez la totalité des malades inclus dans cette étude, ce qui était corrélé à une diminution significative des concentrations sériques de granzymes A et B et des pourcentages de lymphocytes Tc17 et T CD8 cytotoxiques circulants. Simultanément, il existait une diminution des concentrations sériques des ligands de CXCR3 (CXCL9, -10 et -11). Cette corrélation entre l'activité de la maladie et la normalisation de ces paramètres biologiques est un argument plaidant en faveur de l'implication de la réponse immunitaire T CD8 au cours de l'ACG.

Ces résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse suivante : après l'activation des cellules dendritiques, les LT CD4<sup>+</sup> recrutés dans la paroi artérielle des patients atteints d'ACG s'activent et se polarisent en lymphocytes Th17 et Th1 (classique ou non) [83,84,137,138,148,163]. L'IFN- $\gamma$  produit par les lymphocytes Th1 va induire la production de CXCL9, -10 et -11 par les LT CD4<sup>+</sup> et possiblement les cellules résidentes (CML et cellules endothéliales), ce qui va permettre le recrutement des LT CD8<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> circulants. Une fois dans la paroi artérielle, les LT CD8<sup>+</sup> vont libérer le contenu de leurs granules cytotoxiques et participer à la destruction de la paroi artérielle. Ils vont aussi produire des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- $\gamma$  et l'IL-17 et des chémokines (CXCL9, -10 et -11) qui vont conduire au recrutement d'autres lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, puis à leur activation et ainsi créer des boucles d'auto-amplification aboutissant à l'autonomisation de la réponse inflammatoire.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous souhaitons analyser par immunohistochimie l'expression de marqueurs de cytotoxicité (granzyme B, perforine, TiA1 et CD63) par les LT CD8<sup>+</sup> et la production de CXCL9, CXCL10 et CXCL11 dans les BAT de patients atteints d'ACG.

Nous prévoyons également d'étudier le répertoire des LT CD8<sup>+</sup> circulants. Comme pour les LT CD4<sup>+</sup> [157], nous pensons qu'il existe au cours de l'ACG une restriction d'hétérogénéité du TCR des LT CD8<sup>+</sup> circulants, témoignant de leur activation clonale par un ou plusieurs antigène(s). Nous avons donc isolé les LT

CD8<sup>+</sup> circulants de 7 patients atteints d'ACG non traités, 6 patients traités et 7 sujets sains. L'analyse par PCR de la longueur de la séquence CDR3 (*Complementary Determining Region*) du TCR est en cours.

***DISCUSSION***  
***et***  
***PERSPECTIVES***

## DISCUSSION et PERSPECTIVES

---

Les résultats de ce travail de thèse viennent compléter les données de la littérature concernant la physiopathologie de l'ACG et illustrent l'intérêt de développer, dans l'ACG et d'autres maladies auto-immunes, des traitements ciblant l'IL-6 et le contrôle de la balance Th17/Treg.

Même si la responsabilité d'un agent infectieux dans le déclenchement de l'ACG est suspectée [19], sa nature exacte demeure inconnue mais semble activer, via le TLR4, les DC de l'adventice vasculaire [158]. Une fois activées, les DC vont produire diverses chémokines, cytokines et exprimer des molécules de costimulation leur permettant de recruter les LT CD4<sup>+</sup> dans la paroi vasculaire puis de les activer. Dès lors, les LT CD4<sup>+</sup> produisent des cytokines pro-inflammatoires et notamment de l'IFN- $\gamma$  qui active les monocytes/macrophages, lesquels produisent alors de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$  et IL-6) responsables des signes généraux de l'ACG. Les macrophages, stimulés par l'IFN- $\gamma$ , vont ensuite fusionner pour former des cellules géantes multinucléées dont la présence dans la paroi vasculaire est caractéristique de l'ACG. Les cellules géantes et les macrophages vont alors produire des facteurs de croissance (VEGF et PDGF), des métalloprotéases et des radicaux libres oxygénés qui vont aboutir au remodelage et à la destruction de la paroi vasculaire [19,137,138,147,148,158,163].

### ***Polarisation Th1 et Th17 au cours de l'ACG***

L'ACG était auparavant considérée comme une pathologie au cours de laquelle les LT CD4<sup>+</sup> se polarisaient préférentiellement en lymphocytes Th1 [137]. Ensuite, ont été mis en évidence les lymphocytes Th17, une autre sous-population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> caractérisée par sa capacité à produire de l'IL-17, une cytokine fortement pro-inflammatoire [232,233]. Cette sous-population lymphocytaire T a été impliquée dans la physiopathologie de plusieurs pathologies auto-immunes [182,238] et rapidement, leur rôle a été mis en évidence dans l'ACG par l'équipe de C. Weyand [82]. Dans cette étude, les auteurs ont proposé qu'il existe au cours de l'ACG deux voies de réponse lymphocytaire T CD4 distinctes : une voie Th17



sensible à la corticothérapie et une voie Th1 résistante à la corticothérapie. En effet, dans leur étude [82], la corticothérapie a entraîné une diminution significative de l'expression des cytokines de la voie Th17 (IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-23) alors qu'elle n'a pas modifié le niveau d'expression de l'IL-12 (une cytokine de la voie Th1) par les monocytes circulant et infiltrant les artères de sujets atteints d'ACG [82]. L'existence de deux voies distinctes d'activation lymphocytaire T au cours de l'ACG a alors été évoquée : une voie Th17 impliquant des DC productrices d'IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-23 aboutissant à une polarisation Th17 et à la production d'IL-17 qui activerait les cellules endothéliales, les CML et les fibroblastes. Cette voie Th17 serait efficacement bloquée par la corticothérapie alors que la voie Th1, impliquant des DC productrices d'IL-12 et d'IL-18, aboutirait à la production d'IFN- $\gamma$  activant les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules cytotoxiques. Cette voie Th1, indépendante de la précédente, serait résistante à la corticothérapie et à l'origine des manifestations vasculaires chroniques de l'ACG [82,163].

Dans notre étude [83], nous avons confirmé que la réponse Th17 était augmentée au cours de l'ACG et l'avons également montré pour la première fois au cours de la PPR. En effet, nous avons mis en évidence que le pourcentage de lymphocytes Th17 était augmenté dans le sang circulant des patients. De plus, les lymphocytes Th17 infiltraient massivement les lésions d'ACG dans les BAT que nous avons étudiées [83]. Cependant, à l'inverse des travaux de l'équipe de C. Weyand [82], nous n'avons pas retrouvé d'augmentation du pourcentage de lymphocytes Th1 dans le sang des patients atteints d'ACG ou de PPR. De plus, après 3 mois de traitement par corticoïdes, nous avons observé une diminution du pourcentage de lymphocytes Th1 circulants [83]. Nos résultats concernant l'implication de la voie Th1 sont donc discordants avec ceux de l'équipe de C. Weyand. Cependant, il faut signaler quelques différences entre les deux études : dans l'étude de l'équipe de C. Weyand [82], les auteurs n'ont pas utilisé la même durée de stimulation par PMA et ionomycine que dans la notre (4h versus 8h), les prélèvements sanguins chez les patients traités n'ont pas tous été obtenus après la même durée de traitement, et surtout, les patients traités et non traités n'étaient pas les mêmes personnes (absence d'appariement).

Même avec ces discordances, ces deux études [82,83] permettent de mieux comprendre les interactions qui existent entre lymphocytes Th1 et Th17 au cours de

l'ACG. Les résultats de notre étude [83] ne sont pas en faveur de l'hypothèse selon laquelle il existerait au cours de l'ACG deux voies distinctes, Th1 d'une part et Th17 d'autre part. En effet, la différenciation lymphocytaire Th1, Th17 ou même Treg n'est pas un processus figé mais dynamique, ces sous-populations pouvant se redifférencier en d'autres sous-types lymphocytaires, ce qui définit le concept de plasticité [203,229,363]. Ce concept permet d'expliquer l'existence de LT CD4<sup>+</sup> double positifs (IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>), dits Th1/Th17, qui sont significativement augmentés dans le sang circulant des patients atteints d'ACG ou de PPR [82,83]. Lorsque nous avons débuté notre étude, l'équipe de F. Annunziato venait de d'identifier une population lymphocytaire particulière, les LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> qui peuvent, en fonction de leur environnement cytokinique, se différencier en lymphocytes Th17 ou Th1, alors que les LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>-</sup> ne peuvent se polariser qu'en lymphocytes Th1 [269,272]. Les LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> correspondent donc à une population de précurseurs des lymphocytes Th17 et sont en outre pourvus de propriétés plastiques entre les voies Th1, Th1/Th17 et Th17 [203,258,364]. C'est la raison pour laquelle nous avons étudié cette population cellulaire au cours de l'ACG, montrant alors leur implication dans la physiopathologie de cette affection. Cette sous-population lymphocytaire T CD4 exprime CCR6, le ligand de CCL20, qui leur permet d'infiltrer la paroi artérielle [83,265,274]. Ainsi, alors qu'ils représentent environ 10% des LT CD4<sup>+</sup> dans le sang circulant, les LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> infiltrèrent de façon massive la paroi artérielle des patients atteints d'ACG et produisent (*in vitro* et dans la paroi artérielle) de grandes quantités d'IL-17 et d'IFN- $\gamma$ . Ceci illustre encore une fois la plasticité qu'il existe *in situ* entre les voies Th1 et Th17. De plus, nous avons observé que la corticothérapie induisait une diminution significative de la production d'IL-17 et d'IFN- $\gamma$  par les LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> circulants.

En fait, plus qu'une réelle population de précurseurs des lymphocytes Th17, les LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> constituent plutôt un marqueur phénotypique des lymphocytes Th17, Th1/Th17 ou du passage par un stade de différenciation Th17 des lymphocytes Th1 dits « non classiques » [258,265,274]. Le marqueur CD161 permet donc de distinguer les deux types de lymphocytes Th1 : les Th1 classiques (CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD161<sup>-</sup>) et les Th1 non classiques (CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>) [258,364]. Aussi, le fait que nous ayons montré que CD161 était exprimé par la plupart des lymphocytes Th1 infiltrant les BAT de sujets atteints d'ACG permet de prouver qu'il

s'agit de lymphocytes Th1/Th17 ou Th1 non classiques dont la polarisation est probablement passée, au préalable, par un état Th17 [83].

Ces données récentes sur la plasticité des LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> permettent de mieux comprendre les résultats de notre première étude [83] et de proposer une hypothèse alternative à celle de C. Weyand. Plutôt que l'existence de deux voies distinctes dérivant de deux types de DC, nous pensons qu'il n'existe qu'une seule population de DC qui s'activent puis permettent le recrutement dans la paroi artérielle des LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>, via une interaction entre CCR6 et son ligand CCL20. Ensuite, les LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> se polarisent en lymphocytes Th17 puis en Th1/Th17 et enfin en Th1 « non classiques » en raison d'un environnement cytokinique riche en IL-12 et s'appauvrissant en IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-23 après que la corticothérapie ait été débutée [203]. Des arguments en faveur de cette hypothèse ont été apportés par des travaux utilisant un modèle expérimental de colite inflammatoire dans lequel les lymphocytes Th17, par le biais de la production d'IL-17, induisaient la sécrétion d'IL-12 et d'IL-23 par les cellules muqueuses résidentes, aboutissant alors à la différenciation des lymphocytes Th17 en Th1 producteurs d'IFN- $\gamma$  [480]. Les lymphocytes Th17 sont donc capables d'induire leur propre polarisation en Th1 et il est donc possible que la « disparition » des lymphocytes Th17 de la paroi des artères de patients atteints d'ACG au profit de Th1 corresponde en fait à l'histoire naturelle de l'ACG.

Afin d'étayer cette hypothèse, nous souhaitons mesurer dans le sang circulant de patients atteints d'ACG, avant et après corticothérapie, et comparativement à des sujets sains, les pourcentages de lymphocytes Th1 classiques et non classiques.

### ***Réponse Treg au cours de l'ACG***

Les résultats de ce travail de thèse ont également permis de montrer que l'immunologie de l'ACG ne se limitait pas à un excès de réponse Th1 et Th17 mais aussi, et comme dans d'autres maladies auto-immunes [309], qu'il existait un défaut quantitatif en Treg. Nous avons en effet mis en évidence une diminution significative du pourcentage de Treg circulants (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>) au cours de l'ACG et de la PPR [83]. Dans cette étude, nous avons observé que la capacité des Treg à inhiber

la prolifération des LT effecteurs autologues de 10 patients atteints d'ACG ou de PPR était identique à celle de 7 sujets sains appariés pour l'âge. Ces résultats étaient en faveur de l'existence d'un déficit quantitatif en Treg sans déficit fonctionnel associé. Ces données doivent néanmoins être nuancées puisque nous n'avons pas analysé la capacité des Treg à inhiber la production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-17 par les LT effecteurs [83]. Il est en effet possible que, même s'ils en inhibent la prolifération, les Treg ne freinent pas la production d'IFN- $\gamma$  et/ou d'IL-17 par les LT effecteurs au cours de l'ACG, comme cela a été démontré au cours de la PR [393,394,417].

Ces nouvelles données concernant le rôle des Treg au cours de l'ACG conduisent à un changement de paradigme : d'un modèle de déséquilibre de la balance Th1/Th2, nous avons évolué vers un modèle physiopathologique basé sur un déséquilibre de la balance Th17/Treg [83,147,148,405]. La corticothérapie, traitement de référence actuel de l'ACG permet de corriger cet excès de réponse Th17 mais ne corrige pas le déficit quantitatif en Treg. Ce défaut de restauration d'une réponse T régulatrice suffisante pourrait jouer un rôle dans la survenue de rechutes lors de la décroissance de la corticothérapie. Jusqu'à présent, en dehors du méthotrexate, aucun traitement immunosuppresseur et aucune biothérapie n'avait montré d'efficacité dans le traitement de l'ACG [96]. Mais depuis 2011, plusieurs publications ont rapporté des séries de patients atteints d'ACG ou de PPR traités avec succès par tocilizumab [118-131].

Le tocilizumab est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le récepteur de l'IL-6, ce qui lui permet d'agir à la fois sur le récepteur membranaire et le récepteur soluble de l'IL-6. Il a d'abord été développé au cours de la PR où il a démontré son efficacité seul [408] ou en association avec le méthotrexate [409,410]. Compte tenu de l'implication de l'IL-6 dans le contrôle de la balance Th17/Treg, nous avons donc analysé l'effet de ce traitement sur la balance Th17/Treg chez des patients atteints de PR et montré que le blocage de la voie de l'IL-6 par le tocilizumab était capable de corriger la balance Th17/Treg en diminuant le pourcentage de Th17 et en augmentant également celui des Treg [420]. Malgré des discordances concernant l'effet du tocilizumab sur la diminution de la réponse Th17, deux études indépendantes ont récemment confirmé que ce traitement, via le blocage de la voie de l'IL-6, permettait de corriger la balance Th17/Treg en augmentant le pourcentage de Treg circulants [418,421].

Au cours de l'ACG, le rôle physiopathologique clairement démontré de l'IL-6 [116], l'existence d'un déséquilibre de la balance Th17/Treg [83,148] qui peut être corrigé par le tocilizumab [420] et les résultats prometteurs obtenus avec ce traitement chez des patients atteints d'ACG [118-131] font de cette biothérapie bloquant la voie de l'IL-6 un traitement particulièrement prometteur pour la prise en charge de cette vascularite. C'est pourquoi trois essais thérapeutiques prospectifs (ClinicalTrials.gov n°NCT01450137, NCT01791153 et NCT01910038) sont actuellement en cours afin d'évaluer l'intérêt du tocilizumab dans le traitement de l'ACG. L'un de ces essais (HORTOCI, n°NCT01910038) est coordonné par notre équipe et promu par le CHU de Dijon. Il s'agit d'une étude de preuve de concept, de phase II, financée par le PHRC national, qui évalue l'intérêt d'adjoindre à la corticothérapie un traitement par tocilizumab (8 mg/Kg toutes les 4 semaines pour un total de 4 perfusions) afin de diminuer rapidement la dose de corticoïdes. L'objectif est en effet d'atteindre 0,1 mg/Kg/j d'équivalent prednisone après 6 mois de traitement, alors que cette posologie est habituellement atteinte dans moins de 50% des cas au cours de l'ACG [97,481]. En octobre 2014, sept patients sur les 20 prévus au total ont déjà été inclus dans cette étude.

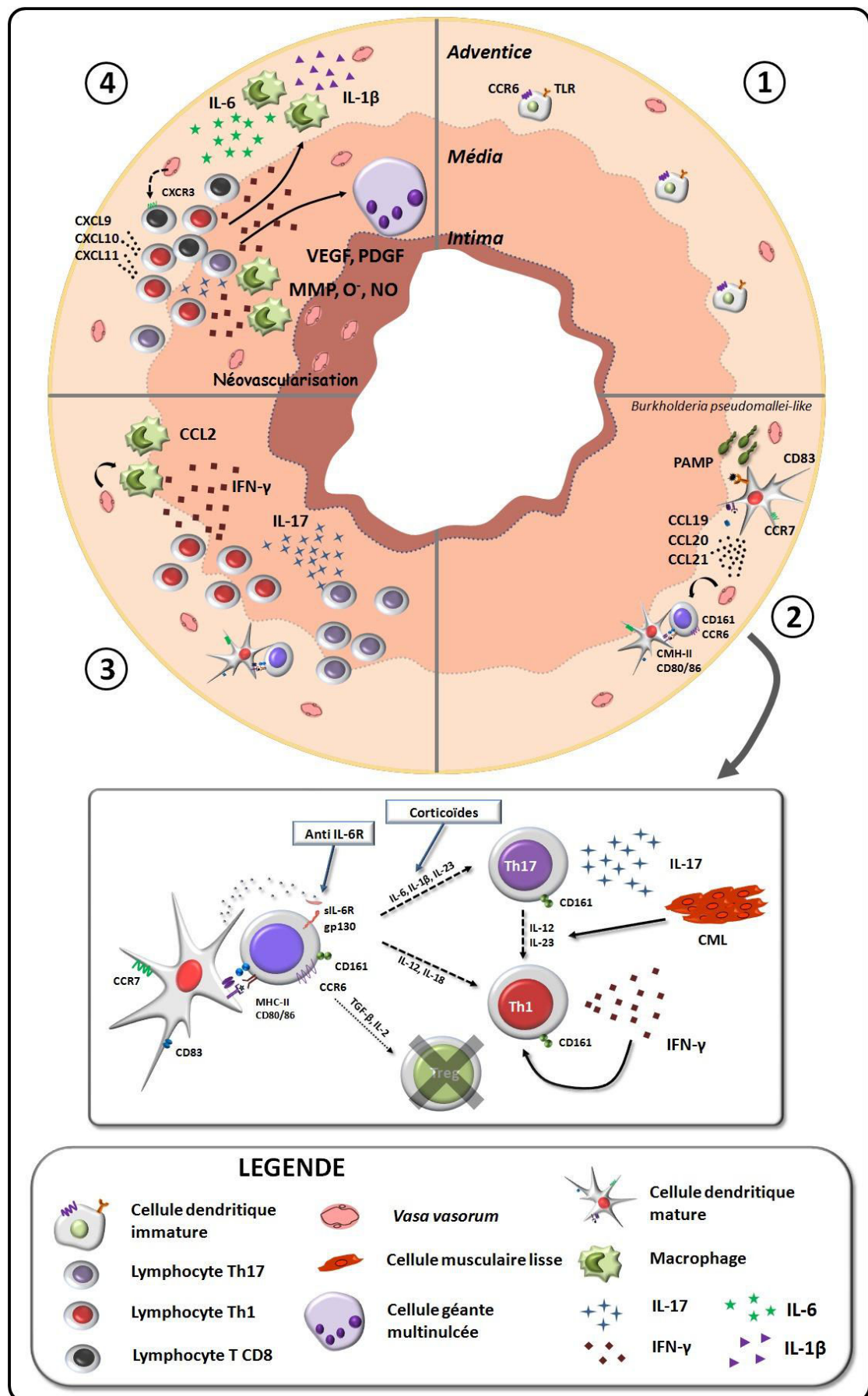
### ***Réponse T CD8 au cours de l'ACG***

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons étudié le rôle des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> au cours de l'ACG. En effet, et alors qu'ils sont impliqués dans d'autres maladies auto-immunes et auto-inflammatoires [425,432], leur rôle dans l'ACG n'est pas bien connu. Les résultats préliminaires dont nous disposons sont en faveur d'une implication des LT CD8<sup>+</sup> au cours de l'ACG puisqu'ils sont présents dans les lésions de vascularite et qu'ils expriment davantage de marqueurs de cytotoxicité (granzyme B et perforine) et d'IL-17 que les LT CD8<sup>+</sup> circulants de sujets sains appariés pour l'âge. L'interaction entre CXCR3 et ses ligands (CXCL9, -10 et -11), voie *up*-régulée par l'IFN- $\gamma$ , pourrait être impliquée dans le recrutement des LT CD8<sup>+</sup> dans les lésions de vascularite. Nous pensons que les LT CD8<sup>+</sup> sont recrutés dans la paroi artérielle suite à la production par les LT CD4<sup>+</sup> d'IFN- $\gamma$  qui va stimuler la production de CXCL9, -10 et -11 par les lymphocytes eux-mêmes et peut être par les cellules résidentes. Une fois présents dans la paroi artérielle, les LT CD8<sup>+</sup> pourraient

alors produire de grandes quantités de molécules cytotoxiques (granzyme B et perforine) et ainsi participer à la destruction de la paroi artérielle. De plus, ils pourraient produire des cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-17 et l'IFN- $\gamma$ , et ainsi participer à la chronicisation de la réponse inflammatoire.

Nos données préliminaires semblent montrer que la corticothérapie est capable d'inhiber la réponse T CD8. En revanche, nous ne disposons pas encore de données concernant l'effet du tocilizumab sur la réponse T CD8.

Les résultats de ce travail de thèse viennent donc compléter les données de la littérature concernant la physiopathologie de l'ACG et nous permettent aujourd'hui de proposer de nouvelles hypothèses concernant le modèle physiopathologique de l'ACG. Ces données sont résumées dans la figure 17.



**Figure 17 : Modèle physiopathologique de l'ACG. (Légende page suivante)**

1/ Artère normale : les cellules dendritiques (DC) résidentes de l'adventice sont à l'état immature. Elles expriment CCR6 et des TLR dont la nature varie en fonction du type d'artère.

2/ Activation des DC par un signal « Danger » (PAMP : *pathogen associated molecular pattern*) par l'intermédiaire des TLR. *Burkholderia pseudomallei-like* pourrait être l'agent infectieux responsable de l'activation des DC. Une fois activées, les DC changent de morphologie, expriment CCR7 et CD83 et produisent des chémokines (CCL19, CCL20 et CCL21) qui vont recruter les LT CD4<sup>+</sup> via les *vasa vasorum* et piéger les DC dans la paroi artérielle. Les DC expriment fortement le CMH-II et les molécules de costimulation CD80 et CD86, ce qui leur permet d'activer les LT CD4<sup>+</sup> reconnaissant l'antigène qu'elles ont apprêté au sein de leurs molécules de CMH-II. Les LT recrutés sont majoritairement caractérisés par un phénotype CCR6<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> et se polarisent en lymphocytes Th17 (en présence d'IL-6, IL-1β et IL-23) et/ou en Th1 non classiques (CD161<sup>+</sup>, en présence d'IL-12 et IL-18). Il existe probablement une 3<sup>ème</sup> voie de différenciation, Th1 classique, impliquant les LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>-</sup>, ces derniers étant minoritaires dans l'infiltrat inflammatoire au sein des lésions de vascularite. Ces cytokines Th1 et Th17 empêchent le développement d'une réponse T régulatrice suffisante pour contrôler l'intensité de la réponse inflammatoire qui va alors se chroniciser. Les lymphocytes Th17 produisent de l'IL-17 qui pourrait entraîner la production d'IL-23 et d'IL-12 par les cellules résidentes, stabilisant ainsi la voie Th17 (via l'IL-23) et induisant une polarisation Th1 (via l'IL-12). Les corticoïdes sont capables d'inhiber la voie Th17 mais n'auraient pas d'effet sur la réponse Th1. Le tocilizumab, anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de l'IL-6 est quant à lui capable de corriger la balance Th17/Treg en diminuant la réponse Th17 et en augmentant le nombre de Treg.

3/ Infiltration lymphocytaire T oligoclonale et polarisation Th1 et Th17. Les DC produisent des cytokines qui vont favoriser la polarisation des LT en lymphocytes Th1 et Th17. En présence d'IL-12, les LT CD4<sup>+</sup> se polarisent en lymphocytes Th1 producteurs d'IFN-γ. En présence d'IL-1β, d'IL-6 et d'IL-23, les LT CD4<sup>+</sup> se polarisent en lymphocytes Th17 producteurs d'IL-17. Suite à la production de CCL2 par les lymphocytes et les cellules musculaires lisses (CML) présentes dans la paroi vasculaire, les monocytes qui expriment CCR2 (le ligand de CCL2) sont recrutés dans la paroi vasculaire et se différencient en macrophages (MP) qui sont à leur tour activés par les cytokines lymphocytaires, notamment l'IFN-γ.

4/ Les MP de l'adventice produisent de grandes quantités d'IL-1β et d'IL-6 qui sont responsables des signes généraux de l'ACG et qui vont entretenir des boucles d'amplification aboutissant à la pérennisation de la réponse inflammatoire. Dans la média, les MP et les cellules géantes produisent des facteurs de croissance : le VEGF provoque une néoangiogenèse qui va accroître le recrutement des cellules inflammatoires, le PDGF est responsable de la migration et de la prolifération des CML aboutissant à l'hyperplasie intimale. Sont aussi produits des métalloprotéases (MMP), du monoxyde d'azote (NO) et des radicaux libres oxygénés (O<sup>•</sup>) qui vont détruire la média et la limitante élastique interne. Ce remodelage vasculaire est à l'origine des manifestations ischémiques de l'ACG. La production d'IFN-γ par les lymphocytes Th1 pourrait également induire une production de CXCL9, CXCL10 et/ou CXCL11 par les lymphocytes et les cellules résidentes et ainsi recruter les LT CD8<sup>+</sup> exprimant CXCR3, le ligand de ces 3 chémokines. Les LT CD8<sup>+</sup> pourraient participer à la destruction de la paroi artérielle et à la chronicisation de la réponse inflammatoire via la production de molécules cytotoxiques (perforine et granzymes), d'IL-17 et d'IFN-γ.

**DC** : cellule dendritique ; **CCL** et **CXCL** : chémokines (famille CC ou CXC) ; **CCR** et **CXCR** : récepteur de chémokine (famille CC ou CXC) ; **CD** : *cluster of differentiation* ; **CMH-II** : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II ; **CML** : cellule musculaire lisse ; **IFN-γ** : interféron-gamma ; **IL** : interleukine ; **LT** : lymphocyte T ; **MMP** : métalloprotéases ; **MP** : macrophage ; **PAMP** : *pathogen associated molecular pattern* ; **O<sup>•</sup>** : radicaux libres oxygénés ; **PDGF** : *platelet-derived growth factor* ; **TLR** : *toll like receptor* ; **VEGF** : *vascular endothelial growth factor*.



Outre l'apport de données nouvelles pour enrichir le modèle physiopathologique de l'ACG, nos résultats soulèvent des interrogations et ouvrent de nouvelles voies d'explorations qui constituent les perspectives de ce travail.

Les différentes études en cours dans notre équipe nous permettent de disposer très régulièrement de prélèvements biologiques (sang et tissus) issus de patients atteints d'ACG et traités soit par corticothérapie seule, soit par corticoïdes et tocilizumab dans le cadre de l'étude HORTOCl. En plus de la comparaison avec une cohorte de sujets sains appariés pour l'âge, nous pourrions donc analyser l'effet du tocilizumab au cours du traitement de l'ACG. A l'avenir, ceci pourrait permettre d'identifier des biomarqueurs prédictifs de bonne réponse ou de résistance à ce traitement.

A plus court terme, nous prévoyons de réaliser les analyses suivantes :

- Etudier l'implication des lymphocytes Th1 classiques ( $CD4^+IFN-\gamma^+CD161^-$ ) et non classiques ( $CD4^+IFN-\gamma^+CD161^+$ ) dans la pathogénie de l'ACG.
- Approfondir l'étude fonctionnelle des Treg en analysant leur capacité à inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-17 et IFN- $\gamma$ ) par les LT effecteurs.
- Poursuivre l'étude des LT  $CD8^+$  au cours de l'ACG :
  - Etude immunohistochimique des BAT de patients atteints d'ACG :
    - expression de marqueurs de cytotoxicité par les LT  $CD8^+$  (granzyme B, perforine, TiA1 et CD63)
    - production *in situ* de CXCL9, CXCL10 et CXCL11
  - Etude du répertoire T des LT  $CD8^+$  circulants grâce à l'analyse par PCR de la longueur de la séquence CDR3 (*Complementary Determining Region*) du TCR.

A plus long terme, nous envisageons la mise au point d'un modèle *in vitro* d'ACG, basé sur des cultures d'artères temporales sur gel 3D (MATRIGEL®).

# ***CONCLUSION***

## CONCLUSION

---

Ce travail de thèse a été axé sur l'étude de la réponse immunitaire T au cours de l'ACG et de la PPR. Dans la première partie de ce travail, nous avons confirmé l'implication des lymphocytes Th17 dans la pathogénie de l'ACG et avons montré pour la première fois leur implication au cours de la PPR. De plus, notre étude des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> a permis de mieux comprendre les mécanismes de plasticité entre les réponses Th1 et Th17 au cours de ces deux pathologies. Nous avons complété ces travaux par l'étude de la réponse T régulatrice en montrant qu'il existe un déficit quantitatif des Treg au cours de l'ACG et de la PPR. Dans la suite de ce travail, nous avons mis en évidence, chez des patients atteints de PR, que le blocage de la voie de signalisation de l'IL-6 par un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de l'IL-6 permet de corriger le déséquilibre de la balance Th17/Treg, en diminuant la réponse Th17 et en augmentant simultanément la réponse T régulatrice, à l'inverse des corticoïdes qui diminuent le pourcentage de Th17 sans corriger le déficit en Treg. Enfin, dans la dernière partie de ce travail, nous avons montré pour la première fois que les LT CD8<sup>+</sup> étaient également impliqués dans la pathogénie de l'ACG et de la PPR.

Ces résultats ont permis de faire progresser les connaissances concernant la physiopathologie de l'ACG et de la PPR, en évoluant d'un modèle articulé autour d'un déséquilibre de la balance Th1/Th2 vers celui d'un déséquilibre de la balance Th17/Treg. Ces données nouvelles permettent de proposer des thérapeutiques mieux ciblées pour l'ACG et la PPR, notamment l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-IL-6R (tocilizumab).

# ***BIBLIOGRAPHIE***

## BIBLIOGRAPHIE

---

1. Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL, et al. Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum* 1994;37:187-92.
2. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, et al. 2012 revised international chapel hill consensus conference nomenclature of vasculitides. *Arthritis Rheum* 2013;65:1-11.
3. Chaudhry IA, Shamsi FA, Elzaridi E, Arat YO, Bosley TM, Riley FC. Epidemiology of giant-cell arteritis in an Arab population: a 22-year study. *Br J Ophthalmol* 2007;91:715-8.
4. Lee JL, Naguwa SM, Cheema GS, Gershwin ME. The geo-epidemiology of temporal (giant cell) arteritis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008;35:88-95.
5. Lugo JZ, Deitch JS, Yu A, Jang JH, Patel R, Slova D, et al. Demographic and laboratory data may predict positive temporal artery biopsy. *J Surg Res* 2011;170:332-5.
6. Pereira LS, Yoon MK, Hwang TN, Hong JE, Ray K, Porco T, et al. Giant cell arteritis in Asians: a comparative study. *Br J Ophthalmol* 2011;95:214-6.
7. Shah A, Jain S. Epidemiology of giant cell arteritis in an Arab population: a 22-year study. Ethnic variation in incidence of giant cell arteritis. *Br J Ophthalmol* 2008;92:724-5.
8. Salvarani C, Crowson CS, O'Fallon WM, Hunder GG, Gabriel SE. Reappraisal of the epidemiology of giant cell arteritis in Olmsted County, Minnesota, over a fifty-year period. *Arthritis Rheum* 2004;51:264-8.
9. Barrier JH, Billaud E, Magadur G. [Respective prevalences and frequencies of Horton's disease and rhizomelic pseudopolyarthritis. Epidemiological study in the Loire-Atlantic department using a general practice research network (RESOMED 44)]. *Rev Med Interne* 1992;13:393-6.
10. Samson M, Jacquin A, Audia S, Daubail B, Devilliers H, Petrella T, et al. Stroke associated with giant cell arteritis: a population-based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014.
11. Combe B, Sany J, Le Quellec A, Clot J, Eliaou JF. Distribution of HLA-DRB1 alleles of patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis in a Mediterranean population. *J Rheumatol* 1998;25:94-8.
12. Weyand CM, Hicok KC, Hunder GG, Goronzy JJ. The HLA-DRB1 locus as a genetic component in giant cell arteritis. Mapping of a disease-linked sequence motif to the antigen binding site of the HLA-DR molecule. *J Clin Invest* 1992;90:2355-61.
13. Gonzalez-Gay MA. Genetic epidemiology. Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Arthritis Res* 2001;3:154-7.
14. Flores-Dominguez C, Hernandez-Pacheco G, Zuniga J, Gamboa R, Granados J, Reyes PA, et al. [Alleles of the major histocompatibility system associated with susceptibility to the development of Takayasu's arteritis]. *Gac Med Mex* 2002;138:177-83.
15. Gonzalez-Gay MA, Hajeer AH, Dababneh A, Garcia-Porrúa C, Matthey DL, Amoli MM, et al. IL-6 promoter polymorphism at position -174 modulates the phenotypic expression of polymyalgia rheumatica in biopsy-proven giant cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:179-84.
16. Gonzalez-Gay MA, Hajeer AH, Dababneh A, Garcia-Porrúa C, Amoli MM, Thomson W, et al. Corticotropin releasing hormone promoter polymorphisms in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:133-8.
17. Duhaut P, Bosshard S, Ducroix JP. Is giant cell arteritis an infectious disease? Biological and epidemiological evidence. *Presse Med* 2004;33:1403-8.
18. Salvarani C, Cantini F, Hunder GG. Polymyalgia rheumatica and giant-cell arteritis. *Lancet* 2008;372:234-45.
19. Ly KH, Regent A, Tamby MC, Mouthon L. Pathogenesis of giant cell arteritis: More than just an inflammatory condition? *Autoimmun Rev* 2010;9:635-45.

20. Koenig CL, Katz BJ, Hernandez-Rodriguez J, Corbera-Bellalta M, Cid MC, Schweizer HP, et al. Identification of a Burkholderia -Like Strain From Temporal Arteries of Subjects with Giant Cell Arteritis. *Arthritis Rheum* 2012;64:S373.
21. Agard C, Barrier JH, Dupas B, Ponge T, Mahr A, Fradet G, et al. Aortic involvement in recent-onset giant cell (temporal) arteritis: a case-control prospective study using helical aortic computed tomodensitometric scan. *Arthritis Rheum* 2008;59:670-6.
22. Borchers AT, Gershwin ME. Giant cell arteritis: A review of classification, pathophysiology, geoepidemiology and treatment. *Autoimmun Rev* 2012;11:A544-54.
23. Gonzalez-Gay MA, Barros S, Lopez-Diaz MJ, Garcia-Porrúa C, Sanchez-Andrade A, Llorca J. Giant cell arteritis: disease patterns of clinical presentation in a series of 240 patients. *Medicine (Baltimore)* 2005;84:269-76.
24. Abdul-Rahman AM, Molteno AC, Bevin TH. The epidemiology of giant cell arteritis in Otago, New Zealand: a 9-year analysis. *N Z Med J* 2011;124:44-52.
25. Hernandez-Rodriguez J, Garcia-Martinez A, Casademont J, Filella X, Esteban MJ, Lopez-Soto A, et al. A strong initial systemic inflammatory response is associated with higher corticosteroid requirements and longer duration of therapy in patients with giant-cell arteritis. *Arthritis Rheum* 2002;47:29-35.
26. Khalifa M, Karmani M, Jaafoura NG, Kaabia N, Letaief AO, Bahri F. Epidemiological and clinical features of giant cell arteritis in Tunisia. *Eur J Intern Med* 2009;20:208-12.
27. Liozon E, Boutros-Toni F, Ly K, Loustaud-Ratti V, Soria P, Vidal E. Silent, or masked, giant cell arteritis is associated with a strong inflammatory response and a benign short term course. *J Rheumatol* 2003;30:1272-6.
28. Smetana GW, Shmerling RH. Does this patient have temporal arteritis? *JAMA* 2002;287:92-101.
29. Salvarani C, Cantini F, Boiardi L, Hunder GG. Polymyalgia rheumatica and giant-cell arteritis. *N Engl J Med* 2002;347:261-71.
30. Salvarani C, Pipitone N, Versari A, Hunder GG. Clinical features of polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:509-21.
31. Hunder GG, Bloch DA, Michel BA, Stevens MB, Arend WP, Calabrese LH, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1122-8.
32. Camellino D, Cimmino MA. Imaging of polymyalgia rheumatica: indications on its pathogenesis, diagnosis and prognosis. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51:77-86.
33. Cantini F, Salvarani C, Olivieri I, Niccoli L, Padula A, Macchioni L, et al. Shoulder ultrasonography in the diagnosis of polymyalgia rheumatica: a case-control study. *J Rheumatol* 2001;28:1049-55.
34. Liozon E, Ly KH, Robert PY. [Ocular complications of giant cell arteritis]. *Rev Med Interne* 2013;34:421-30.
35. Klein RG, Hunder GG, Stanson AW, Sheps SG. Large artery involvement in giant cell (temporal) arteritis. *Ann Intern Med* 1975;83:806-12.
36. Ostberg G. Temporal arteritis in a large necropsy series. *Ann Rheum Dis* 1971;30:224-35.
37. Prieto-Gonzalez S, Arguis P, Garcia-Martinez A, Espigol-Frigole G, Tavera-Bahillo I, Butjosa M, et al. Large vessel involvement in biopsy-proven giant cell arteritis: prospective study in 40 newly diagnosed patients using CT angiography. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1170-6.
38. Espitia O, Agard C. [Aortitis in giant cell arteritis and its complications]. *Rev Med Interne* 2013;34:412-20.
39. Espitia O, Neel A, Leux C, Connault J, Espitia-Thibault A, Ponge T, et al. Giant cell arteritis with or without aortitis at diagnosis. A retrospective study of 22 patients with longterm followup. *J Rheumatol* 2012;39:2157-62.
40. Evans JM, Bowles CA, Bjornsson J, Mullany CJ, Hunder GG. Thoracic aortic aneurysm and rupture in giant cell arteritis. A descriptive study of 41 cases. *Arthritis Rheum* 1994;37:1539-47.

41. Evans JM, O'Fallon WM, Hunder GG. Increased incidence of aortic aneurysm and dissection in giant cell (temporal) arteritis. A population-based study. *Ann Intern Med* 1995;122:502-7.
42. Garcia-Martinez A, Hernandez-Rodriguez J, Arguis P, Paredes P, Segarra M, Lozano E, et al. Development of aortic aneurysm/dilatation during the followup of patients with giant cell arteritis: a cross-sectional screening of fifty-four prospectively followed patients. *Arthritis Rheum* 2008;59:422-30.
43. Smeeth L, Cook C, Hall AJ. Incidence of diagnosed polymyalgia rheumatica and temporal arteritis in the United Kingdom, 1990-2001. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1093-8.
44. Robson JC, Kiran A, Maskell J, Hutchings A, Arden N, Dasgupta B, et al. The relative risk of aortic aneurysm in patients with giant cell arteritis compared with the general population of the UK. *Ann Rheum Dis* 2013.
45. Assie C, Marie I. [Giant cell arteritis-related upper/lower limb vasculitis]. *Presse Med* 2011;40:151-61.
46. Assie C, Janvresse A, Plissonnier D, Levesque H, Marie I. Long-term follow-up of upper and lower extremity vasculitis related to giant cell arteritis: a series of 36 patients. *Medicine (Baltimore)* 2011;90:40-51.
47. Tomasson G, Peloquin C, Mohammad A, Love TJ, Zhang Y, Choi HK, et al. Risk for cardiovascular disease early and late after a diagnosis of giant-cell arteritis: a cohort study. *Ann Intern Med* 2014;160:73-80.
48. Caselli RJ, Hunder GG, Whisnant JP. Neurologic disease in biopsy-proven giant cell (temporal) arteritis. *Neurology* 1988;38:352-9.
49. Gonzalez-Gay MA, Vazquez-Rodriguez TR, Gomez-Acebo I, Pego-Reigosa R, Lopez-Diaz MJ, Vazquez-Trinanes MC, et al. Strokes at time of disease diagnosis in a series of 287 patients with biopsy-proven giant cell arteritis. *Medicine (Baltimore)* 2009;88:227-35.
50. Wiszniewska M, Devuyst G, Bogousslavsky J. Giant cell arteritis as a cause of first-ever stroke. *Cerebrovasc Dis* 2007;24:226-30.
51. Caselli RJ, Daube JR, Hunder GG, Whisnant JP. Peripheral neuropathic syndromes in giant cell (temporal) arteritis. *Neurology* 1988;38:685-9.
52. Valstar MH, Terpstra WF, de Jong RS. Pericardial and pleural effusion in giant cell arteritis. *Am J Med* 2003;114:708-9.
53. Larson TS, Hall S, Hepper NG, Hunder GG. Respiratory tract symptoms as a clue to giant cell arteritis. *Ann Intern Med* 1984;101:594-7.
54. Sujobert P, Fardet L, Marie I, Duhaut P, Cohen P, Grange C, et al. Mesenteric ischemia in giant cell arteritis: 6 cases and a systematic review. *J Rheumatol* 2007;34:1727-32.
55. Bajocchi G, Zamorani G, Cavazza A, Pipitone N, Versari A, Boiardi L, et al. Giant-cell arteritis of the female genital tract associated with occult temporal arteritis and FDG-PET evidence of large-vessel vasculitis. *Clin Exp Rheumatol* 2007;25:S36-9.
56. Litwack KD, Bohan A, Silverman L. Granulomatous liver disease and giant cell arteritis. Case report and literature review. *J Rheumatol* 1977;4:307-12.
57. Liozon E, Loustaud-Ratti V, Soria P, Bezanahary H, Fauchais AL, Nadalon S, et al. [Disease associations in 250 patients with temporal (giant cell) arteritis]. *Presse Med* 2004;33:1304-12.
58. Gonzalez-Gay MA, Lopez-Diaz MJ, Barros S, Garcia-Porrúa C, Sanchez-Andrade A, Paz-Carreira J, et al. Giant cell arteritis: laboratory tests at the time of diagnosis in a series of 240 patients. *Medicine (Baltimore)* 2005;84:277-90.
59. Salvarani C, Hunder GG. Giant cell arteritis with low erythrocyte sedimentation rate: frequency of occurrence in a population-based study. *Arthritis Rheum* 2001;45:140-5.
60. Cid MC, Font C, Oristrell J, de la Sierra A, Coll-Vinent B, Lopez-Soto A, et al. Association between strong inflammatory response and low risk of developing visual loss and other cranial ischemic complications in giant cell (temporal) arteritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:26-32.

61. Cid MC, Cervera R, Font J, Lopez-Soto A, Pallares L, Navarro M, et al. Late thrombotic events in patients with temporal arteritis and anticardiolipin antibodies. *Clin Exp Rheumatol* 1990;8:359-63.
62. Duhaut P, Berruyer M, Pinede L, Demolombe-Rague S, Loire R, Seydoux D, et al. Anticardiolipin antibodies and giant cell arteritis: a prospective, multicenter case-control study. *Groupe de Recherche sur l'Arterite a Cellules Geantes. Arthritis Rheum* 1998;41:701-9.
63. Liozon E, Roblot P, Paire D, Loustaud V, Liozon F, Vidal E, et al. Anticardiolipin antibody levels predict flares and relapses in patients with giant-cell (temporal) arteritis. A longitudinal study of 58 biopsy-proven cases. *Rheumatology (Oxford)* 2000;39:1089-94.
64. Liozon E, Roussel V, Roblot P, Liozon F, Preud'Homme JL, Loustaud V, et al. Absence of anti-beta2 glycoprotein I antibodies in giant cell arteritis: a study of 45 biopsy-proven cases. *Br J Rheumatol* 1998;37:1129-31.
65. Manna R, Latteri M, Cristiano G, Todaro L, Scuderi F, Gasbarrini G. Anticardiolipin antibodies in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: a study of 40 cases. *Br J Rheumatol* 1998;37:208-10.
66. Liozon F, Jauberteau-Marchan MO, Boutros-Toni F, Barrier JH, Dupond JL, Roblot P, et al. [Anticardiolipin antibodies and Horton disease]. *Ann Med Interne (Paris)* 1995;146:541-7.
67. Navarro M, Cervera R, Font J, Reverter JC, Monteagudo J, Escolar G, et al. Anti-endothelial cell antibodies in systemic autoimmune diseases: prevalence and clinical significance. *Lupus* 1997;6:521-6.
68. Servettaz A, Guilpain P, Tamas N, Kaveri SV, Camoin L, Mouthon L. Natural anti-endothelial cell antibodies. *Autoimmun Rev* 2008;7:426-30.
69. Domiciano DS, Carvalho JF, Shoenfeld Y. Pathogenic role of anti-endothelial cell antibodies in autoimmune rheumatic diseases. *Lupus* 2009;18:1233-8.
70. Regent A, Dib H, Ly KH, Agard C, Tamby MC, Tamas N, et al. Identification of target antigens of anti-endothelial cell and anti-vascular smooth muscle cell antibodies in patients with giant cell arteritis: a proteomic approach. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R107.
71. Baerlecken NT, Linnemann A, Gross WL, Moosig F, Vazquez-Rodriguez TR, Gonzalez-Gay MA, et al. Association of ferritin autoantibodies with giant cell arteritis/polymyalgia rheumatica. *Ann Rheum Dis* 2012;71:943-7.
72. Regent A, Ly KH, Blet A, Agard C, Puechal X, Tamas N, et al. Contribution of antiferritin antibodies to diagnosis of giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2013;72:1269-70.
73. Baldini M, Maugeri N, Ramirez GA, Giacomassi C, Castiglioni A, Prieto-Gonzalez S, et al. Selective up-regulation of the soluble pattern-recognition receptor pentraxin 3 and of vascular endothelial growth factor in giant cell arteritis: relevance for recent optic nerve ischemia. *Arthritis Rheum* 2012;64:854-65.
74. Achkar AA, Lie JT, Hunder GG, O'Fallon WM, Gabriel SE. How does previous corticosteroid treatment affect the biopsy findings in giant cell (temporal) arteritis? *Ann Intern Med* 1994;120:987-92.
75. Narvaez J, Bernad B, Roig-Vilaseca D, Garcia-Gomez C, Gomez-Vaquero C, Juanola X, et al. Influence of previous corticosteroid therapy on temporal artery biopsy yield in giant cell arteritis. *Semin Arthritis Rheum* 2007;37:13-9.
76. Mukhtyar C, Guillevin L, Cid MC, Dasgupta B, de Groot K, Gross W, et al. EULAR recommendations for the management of large vessel vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2009;68:318-23.
77. Mahr A, Saba M, Kambouchner M, Polivka M, Baudrimont M, Brocheriou I, et al. Temporal artery biopsy for diagnosing giant cell arteritis: the longer, the better? *Ann Rheum Dis* 2006;65:826-8.
78. Breuer GS, Neshet G, Neshet R. Rate of discordant findings in bilateral temporal artery biopsy to diagnose giant cell arteritis. *J Rheumatol* 2009;36:794-6.
79. Brack A, Martinez-Taboada V, Stanson A, Goronzy JJ, Weyand CM. Disease pattern in cranial and large-vessel giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:311-7.



80. Lally L, Narula N, Pernis AB, Huang WT, Udeh U, Spiera RF. A3.33 Increased rho-kinase activity in temporal artery biopsies from patients with giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2014;73 Suppl 1:A55.
81. Isgro J, Gupta S, Jacek E, Pavri T, Duculan R, Kim M, et al. Enhanced rho-associated protein kinase activation in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2013;65:1592-602.
82. Deng J, Younge BR, Olshen RA, Goronzy JJ, Weyand CM. Th17 and Th1 T-cell responses in giant cell arteritis. *Circulation* 2010;121:906-15.
83. Samson M, Audia S, Fraszczak J, Trad M, Ornetti P, Lakomy D, et al. Th1 and Th17 lymphocytes expressing CD161 are implicated in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica pathogenesis. *Arthritis Rheum* 2012;64:3788-98.
84. Terrier B, Geri G, Chaara W, Allenbach Y, Rosenzweig M, Costedoat-Chalumeau N, et al. Interleukin-21 modulates Th1 and Th17 responses in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 2012;64:2001-11.
85. Elling P, Olsson AT, Elling H. Synchronous variations of the incidence of temporal arteritis and polymyalgia rheumatica in different regions of Denmark; association with epidemics of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *J Rheumatol* 1996;23:112-9.
86. Karassa FB, Matsagas MI, Schmidt WA, Ioannidis JP. Meta-analysis: test performance of ultrasonography for giant-cell arteritis. *Ann Intern Med* 2005;142:359-69.
87. Schmidt WA, Kraft HE, Vorpahl K, Volker L, Gromnica-Ihle EJ. Color duplex ultrasonography in the diagnosis of temporal arteritis. *N Engl J Med* 1997;337:1336-42.
88. Schmidt WA, Seifert A, Gromnica-Ihle E, Krause A, Natusch A. Ultrasound of proximal upper extremity arteries to increase the diagnostic yield in large-vessel giant cell arteritis. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:96-101.
89. Bley TA, Weiben O, Uhl M, Vaith P, Schmidt D, Warnatz K, et al. Assessment of the cranial involvement pattern of giant cell arteritis with 3T magnetic resonance imaging. *Arthritis Rheum* 2005;52:2470-7.
90. Blockmans D, de Ceuninck L, Vanderschueren S, Knockaert D, Mortelmans L, Bobbaers H. Repetitive 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in giant cell arteritis: a prospective study of 35 patients. *Arthritis Rheum* 2006;55:131-7.
91. Blockmans D, Maes A, Stroobants S, Nuyts J, Bormans G, Knockaert D, et al. New arguments for a vasculitic nature of polymyalgia rheumatica using positron emission tomography. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38:444-7.
92. Besson FL, Parienti JJ, Bienvenu B, Prior JO, Costo S, Bouvard G, et al. Diagnostic performance of (1)(8)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in giant cell arteritis: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011;38:1764-72.
93. Liozon E, Monteil J, Ly KH, Vidal E. [Vasculitis assessment with [18F]FDG positron emission tomography]. *Rev Med Interne* 2010;31:417-27.
94. Yun M, Jang S, Cucchiara A, Newberg AB, Alavi A. 18F FDG uptake in the large arteries: a correlation study with the atherogenic risk factors. *Semin Nucl Med* 2002;32:70-6.
95. Walter MA, Melzer RA, Schindler C, Muller-Brand J, Tyndall A, Nitzsche EU. The value of [18F]FDG-PET in the diagnosis of large-vessel vasculitis and the assessment of activity and extent of disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005;32:674-81.
96. Sailer L, Pugnet G, Bienvenu B. [Treatment of giant cell arteritis.]. *Rev Med Interne* 2013.
97. Proven A, Gabriel SE, Orces C, O'Fallon WM, Hunder GG. Glucocorticoid therapy in giant cell arteritis: duration and adverse outcomes. *Arthritis Rheum* 2003;49:703-8.
98. Kyle V, Hazleman BL. Treatment of polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. I. Steroid regimens in the first two months. *Ann Rheum Dis* 1989;48:658-61.
99. Kyle V. Treatment of polymyalgia rheumatica/giant cell arteritis. *Baillieres Clin Rheumatol* 1991;5:485-91.
100. Mariette X BG, Hachulla E, DeBandt M, Larroche C, Puechal X, Maurier F, de Wazieres B, Quemeneur T, Ravaud P. Results of a Randomized Controlled Study of

Adalimumab for Steroid Sparing in Patients with Giant-Cell Arteritis. *Arthritis Rheum* 2011;63:S589.

**101.** David-Chausse J, Dehais J, Leman A. [Results of a regional survey on the treatment of rhizomelic pseudopolyarthritis and temporal arteritis. Apropos of 242 cases treated by various modalities with synthetic antimalarials, corticoids and non-steroidal anti-inflammatory agents]. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1983;50:563-71.

**102.** Gouet D, Marechaud R, Le Berre D, Alcalay M, Becq-Giraudon B, Boissonnot L, et al. [Prognosis of treated temporal arteritis. Retrospective study of 87 cases]. *Presse Med* 1986;15:603-6.

**103.** De Silva M, Hazleman BL. Azathioprine in giant cell arteritis/polymyalgia rheumatica: a double-blind study. *Ann Rheum Dis* 1986;45:136-8.

**104.** Catanoso MG, Macchioni P, Boiardi L, Pipitone N, Salvarani C. Treatment of refractory polymyalgia rheumatica with etanercept: an open pilot study. *Arthritis Rheum* 2007;57:1514-9.

**105.** Hoffman GS, Cid MC, Rendt-Zagar KE, Merkel PA, Weyand CM, Stone JH, et al. Infliximab for maintenance of glucocorticosteroid-induced remission of giant cell arteritis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007;146:621-30.

**106.** Martinez-Taboada VM, Rodriguez-Valverde V, Carreno L, Lopez-Longo J, Figueroa M, Belzunegui J, et al. A double-blind placebo controlled trial of etanercept in patients with giant cell arteritis and corticosteroid side effects. *Ann Rheum Dis* 2008;67:625-30.

**107.** Ferraccioli G, Salaffi F, De Vita S, Casatta L, Bartoli E. Methotrexate in polymyalgia rheumatica: preliminary results of an open, randomized study. *J Rheumatol* 1996;23:624-8.

**108.** van der Veen MJ, Dinant HJ, van Booma-Frankfort C, van Albada-Kuipers GA, Bijlsma JW. Can methotrexate be used as a steroid sparing agent in the treatment of polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis? *Ann Rheum Dis* 1996;55:218-23.

**109.** Jover JA, Hernandez-Garcia C, Morado IC, Vargas E, Banares A, Fernandez-Gutierrez B. Combined treatment of giant-cell arteritis with methotrexate and prednisone. a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 2001;134:106-14.

**110.** Spiera RF, Mitnick HJ, Kupersmith M, Richmond M, Spiera H, Peterson MG, et al. A prospective, double-blind, randomized, placebo controlled trial of methotrexate in the treatment of giant cell arteritis (GCA). *Clin Exp Rheumatol* 2001;19:495-501.

**111.** Spiera RF, Paget S, Spiera H. Methotrexate in giant-cell arteritis. *Ann Intern Med* 2001;135:1006-7.

**112.** de Boysson H, Boutemy J, Creveuil C, Ollivier Y, Letellier P, Pagnoux C, et al. Is there a place for cyclophosphamide in the treatment of giant-cell arteritis? A case series and systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 2013;43:105-12.

**113.** Looock J, Henes J, Kotter I, Witte T, Lamprecht P, Schirmer M, et al. Treatment of refractory giant cell arteritis with cyclophosphamide: a retrospective analysis of 35 patients from three centres. *Clin Exp Rheumatol* 2012;30:S70-6.

**114.** Quartuccio L, Maset M, De Maglio G, Pontarini E, Fabris M, Mansutti E, et al. Role of oral cyclophosphamide in the treatment of giant cell arteritis. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51:1677-86.

**115.** Liozon F, Vidal E, Barrier J. Does dapsone have a role in the treatment of temporal arteritis with regard to efficacy and toxicity? *Clin Exp Rheumatol* 1993;11:694-5.

**116.** Roche NE, Fulbright JW, Wagner AD, Hunder GG, Goronzy JJ, Weyand CM. Correlation of interleukin-6 production and disease activity in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1993;36:1286-94.

**117.** Goronzy JJ, Weyand CM. Cytokines in giant-cell arteritis. *Cleve Clin J Med* 2002;69 Suppl 2:SII91-4.

**118.** Ashraf FA, Anjum S, Hussaini A, Fraser A. Refractory PMR with aortitis: life-saving treatment with anti-IL6 monoclonal antibody (tocilizumab) and surgical reconstruction of the ascending aorta. *BMJ Case Rep* 2013;2013.

**119.** Isik M, Kilic L, Dogan I, Calguneri M. Tocilizumab for giant cell arteritis: an amazing result. *Rheumatol Int* 2012.

- 120.** Macchioni P, Boiardi L, Catanoso M, Pulsatelli L, Pipitone N, Meliconi R, et al. Tocilizumab for polymyalgia rheumatica: Report of two cases and review of the literature. *Semin Arthritis Rheum* 2013.
- 121.** Vinit J, Bielefeld P, Muller G, Besancenot JF. Efficacy of tocilizumab in refractory giant cell arteritis. *Joint Bone Spine* 2012.
- 122.** Salvarani C, Magnani L, Catanoso M, Pipitone N, Versari A, Dardani L, et al. Tocilizumab: a novel therapy for patients with large-vessel vasculitis. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51:151-6.
- 123.** Seitz M, Reichenbach S, Bonel HM, Adler S, Wermelinger F, Villiger PM. Rapid induction of remission in large vessel vasculitis by IL-6 blockade. A case series. *Swiss Med Wkly* 2011;141:w13156.
- 124.** Unizony S, Arias-Urdaneta L, Miloslavsky E, Arvikar S, Khosroshahi A, Keroack B, et al. Tocilizumab for the treatment of large-vessel vasculitis (giant cell arteritis, Takayasu arteritis) and polymyalgia rheumatica. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012;64:1720-9.
- 125.** Unizony S, Stone JH, Stone JR. New treatment strategies in large-vessel vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 2013;25:3-9.
- 126.** Lurati A, Bertani L, Re KA, Marrazza M, Bompane D, Scarpellini M. Successful treatment of a patient with giant cell vasculitis (horton arteritis) with tocilizumab a humanized anti-interleukin-6 receptor antibody. *Case Rep Rheumatol* 2012;2012:639612.
- 127.** Besada E, Nossent JC. Ultrasonographic resolution of the vessel wall oedema with modest clinical improvement in a large-vessel vasculitis patient treated with tocilizumab. *Clin Rheumatol* 2012;31:1263-5.
- 128.** Fernandez-Fernandez FJ, Ameneiros-Lago E, Sesma P. Might tocilizumab be useful in patients with giant-cell arteritis and normal ESR? *Swiss Med Wkly* 2012;142:0.
- 129.** Sciascia S, Rossi D, Roccatello D. Interleukin 6 blockade as steroid-sparing treatment for 2 patients with giant cell arteritis. *J Rheumatol* 2011;38:2080-1.
- 130.** Beyer C, Axmann R, Sahinbegovic E, Distler JH, Manger B, Schett G, et al. Anti-interleukin 6 receptor therapy as rescue treatment for giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1874-5.
- 131.** Christidis D, Jain S, Das Gupta B. Successful use of tocilizumab in polymyalgic onset biopsy positive GCA with large vessel involvement. *BMJ Case Rep* 2011;2011.
- 132.** Le Page L, Duhaut P, Seydoux D, Bosshard S, Ecochard R, Abbas F, et al. [Incidence of cardiovascular events in giant cell arteritis: preliminary results of a prospective double cohort study (GRACG)]. *Rev Med Interne* 2006;27:98-105.
- 133.** Gonzalez-Gay MA, Pineiro A, Gomez-Gigirey A, Garcia-Porrúa C, Pego-Reigosa R, Dierssen-Sotos T, et al. Influence of traditional risk factors of atherosclerosis in the development of severe ischemic complications in giant cell arteritis. *Medicine (Baltimore)* 2004;83:342-7.
- 134.** Wei L, MacDonald TM, Walker BR. Taking glucocorticoids by prescription is associated with subsequent cardiovascular disease. *Ann Intern Med* 2004;141:764-70.
- 135.** Souverein PC, Berard A, Van Staa TP, Cooper C, Egberts AC, Leufkens HG, et al. Use of oral glucocorticoids and risk of cardiovascular and cerebrovascular disease in a population based case-control study. *Heart* 2004;90:859-65.
- 136.** Maradit Kremers H, Reinalda MS, Crowson CS, Davis JM, 3rd, Hunder GG, Gabriel SE. Glucocorticoids and cardiovascular and cerebrovascular events in polymyalgia rheumatica. *Arthritis Rheum* 2007;57:279-86.
- 137.** Weyand CM, Goronzy JJ. Medium- and large-vessel vasculitis. *N Engl J Med* 2003;349:160-9.
- 138.** Weyand CM, Goronzy JJ. Immune mechanisms in medium and large-vessel vasculitis. *Nat Rev Rheumatol* 2013;9:731-40.
- 139.** Lee MS, Smith SD, Galor A, Hoffman GS. Antiplatelet and anticoagulant therapy in patients with giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:3306-9.
- 140.** Nesher G, Berkun Y, Mates M, Baras M, Rubinow A, Sonnenblick M. Low-dose aspirin and prevention of cranial ischemic complications in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:1332-7.

141. Nesher G, Berkun Y, Mates M, Baras M, Nesher R, Rubinow A, et al. Risk factors for cranial ischemic complications in giant cell arteritis. *Medicine (Baltimore)* 2004;83:114-22.
142. Gonzalez-Gay MA, Blanco R, Rodriguez-Valverde V, Martinez-Taboada VM, Delgado-Rodriguez M, Figueroa M, et al. Permanent visual loss and cerebrovascular accidents in giant cell arteritis: predictors and response to treatment. *Arthritis Rheum* 1998;41:1497-504.
143. Salvarani C, Cimino L, Macchioni P, Consonni D, Cantini F, Bajocchi G, et al. Risk factors for visual loss in an Italian population-based cohort of patients with giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 2005;53:293-7.
144. Mackie SL, Dasgupta B, Hordon L, Gough A, Green M, Hollywood J, et al. Ischaemic manifestations in giant cell arteritis are associated with area level socio-economic deprivation, but not cardiovascular risk factors. *Rheumatology (Oxford)* 2011;50:2014-22.
145. Narvaez J, Bernad B, Nolla JM, Valverde J. Statin therapy does not seem to benefit giant cell arteritis. *Semin Arthritis Rheum* 2007;36:322-7.
146. Garcia-Martinez A, Hernandez-Rodriguez J, Grau JM, Cid MC. Treatment with statins does not exhibit a clinically relevant corticosteroid-sparing effect in patients with giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 2004;51:674-8.
147. Samson M, Bonnotte B. [Giant-cell arteritis pathogenesis]. *Presse Med* 2012;41:937-47.
148. Samson M, Audia S, Martin L, Janikashvili N, Bonnotte B. Pathogenesis of giant cell arteritis: new insight into the implication of CD161+ T cells. *Clin Exp Rheumatol* 2013;31:S65-73.
149. Salvarani C, Giannini C, Miller DV, Hunder G. Giant cell arteritis: Involvement of intracranial arteries. *Arthritis Rheum* 2006;55:985-9.
150. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.
151. Krupa WM, Dewan M, Jeon MS, Kurtin PJ, Younge BR, Goronzy JJ, et al. Trapping of misdirected dendritic cells in the granulomatous lesions of giant cell arteritis. *Am J Pathol* 2002;161:1815-23.
152. Ma-Krupa W, Jeon MS, Spoerl S, Tedder TF, Goronzy JJ, Weyand CM. Activation of arterial wall dendritic cells and breakdown of self-tolerance in giant cell arteritis. *J Exp Med* 2004;199:173-83.
153. Pryshchep O, Ma-Krupa W, Younge BR, Goronzy JJ, Weyand CM. Vessel-specific Toll-like receptor profiles in human medium and large arteries. *Circulation* 2008;118:1276-84.
154. Brack A, Geisler A, Martinez-Taboada VM, Younge BR, Goronzy JJ, Weyand CM. Giant cell vasculitis is a T cell-dependent disease. *Mol Med* 1997;3:530-43.
155. Martinez-Taboada V, Hunder NN, Hunder GG, Weyand CM, Goronzy JJ. Recognition of tissue residing antigen by T cells in vasculitic lesions of giant cell arteritis. *J Mol Med (Berl)* 1996;74:695-703.
156. Martinez-Taboada VM, Goronzy JJ, Weyand CM. Clonally expanded CD8 T cells in patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;79:263-70.
157. Weyand CM, Schonberger J, Oppitz U, Hunder NN, Hicok KC, Goronzy JJ. Distinct vascular lesions in giant cell arteritis share identical T cell clonotypes. *J Exp Med* 1994;179:951-60.
158. Piggott K, Biousse V, Newman NJ, Goronzy JJ, Weyand CM. Vascular damage in giant cell arteritis. *Autoimmunity* 2009;42:596-604.
159. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunol* 2008;20:1361-8.
160. Samson M, Audia S, Fraszczak J, Trad M, Ornetti P, Lakomy D, et al. Th1 and Th17 lymphocytes expressing CD161 are implicated in Giant Cell Arteritis and Polymyalgia Rheumatica pathogenesis. *Arthritis Rheum* 2012;In Press.
161. Samson M AS, Lakomy D, Trad M, Devilliers H, Vinit J, Manckoundia CP, Maillefert JF, Martin L, Besancenot JF, Lorcerie B, Bonnotte B. Balance Th17/Treg au cours de la

maladie de Horton et la Pseudopolyarthrite rhizomélisque : une nouvelle cible thérapeutique ? *Rev Med Interne* 2010;31:S358.

**162.** Terrier B, Geri G, Chaara W, Allenbach Y, Rosenzwaig M, Costedoat-Chalumeau N, et al. IL-21 modulates Th1 and Th17 responses in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 2011.

**163.** Weyand CM, Younge BR, Goronzy JJ. IFN-gamma and IL-17: the two faces of T-cell pathology in giant cell arteritis. *Curr Opin Rheumatol* 2011;23:43-9.

**164.** Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 2008;9:239-44.

**165.** Weyand CM, Goronzy JJ. Giant-cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Ann Intern Med* 2003;139:505-15.

**166.** Cid MC, Hoffman MP, Hernandez-Rodriguez J, Segarra M, Elkin M, Sanchez M, et al. Association between increased CCL2 (MCP-1) expression in lesions and persistence of disease activity in giant-cell arteritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:1356-63.

**167.** Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 1997;90:909-28.

**168.** Hernandez-Rodriguez J, Segarra M, Vilardell C, Sanchez M, Garcia-Martinez A, Esteban MJ, et al. Elevated production of interleukin-6 is associated with a lower incidence of disease-related ischemic events in patients with giant-cell arteritis: angiogenic activity of interleukin-6 as a potential protective mechanism. *Circulation* 2003;107:2428-34.

**169.** Hernandez-Rodriguez J, Segarra M, Vilardell C, Sanchez M, Garcia-Martinez A, Esteban MJ, et al. Tissue production of pro-inflammatory cytokines (IL-1beta, TNFalpha and IL-6) correlates with the intensity of the systemic inflammatory response and with corticosteroid requirements in giant-cell arteritis. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43:294-301.

**170.** Nikkari ST, Hoyhtya M, Isola J, Nikkari T. Macrophages contain 92-kd gelatinase (MMP-9) at the site of degenerated internal elastic lamina in temporal arteritis. *Am J Pathol* 1996;149:1427-33.

**171.** Segarra M, Garcia-Martinez A, Sanchez M, Hernandez-Rodriguez J, Lozano E, Grau JM, et al. Gelatinase expression and proteolytic activity in giant-cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1429-35.

**172.** Weyand CM, Wagner AD, Bjornsson J, Goronzy JJ. Correlation of the topographical arrangement and the functional pattern of tissue-infiltrating macrophages in giant cell arteritis. *J Clin Invest* 1996;98:1642-9.

**173.** Rodriguez-Pla A, Bosch-Gil JA, Rossello-Urgell J, Huguet-Redecilla P, Stone JH, Vilardell-Tarres M. Metalloproteinase-2 and -9 in giant cell arteritis: involvement in vascular remodeling. *Circulation* 2005;112:264-9.

**174.** Kaiser M, Weyand CM, Bjornsson J, Goronzy JJ. Platelet-derived growth factor, intimal hyperplasia, and ischemic complications in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:623-33.

**175.** Kaiser M, Younge B, Bjornsson J, Goronzy JJ, Weyand CM. Formation of new vasa vasorum in vasculitis. Production of angiogenic cytokines by multinucleated giant cells. *Am J Pathol* 1999;155:765-74.

**176.** Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002;90:251-62.

**177.** Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Llorca J, Hajeer AH, Branas F, Dababneh A, et al. Visual manifestations of giant cell arteritis. Trends and clinical spectrum in 161 patients. *Medicine (Baltimore)* 2000;79:283-92.

**178.** Rauzy O, Fort M, Nourhashemi F, Alric L, Juchet H, Ecoiffier M, et al. Relation between HLA DRB1 alleles and corticosteroid resistance in giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 1998;57:380-2.

**179.** Banks PM, Cohen MD, Ginsburg WW, Hunder GG. Immunohistologic and cytochemical studies of temporal arteritis. *Arthritis Rheum* 1983;26:1201-7.

**180.** Lavignac C, Jauberteau-Marchan MO, Liozon E, Vidal E, Catanzano G, Liozon F. [Immunohistochemical study of lesions in Horton's temporal arteritis before and during corticotherapy]. *Rev Med Interne* 1996;17:814-20.

181. Chatelain D, Duhaut P, Schmidt J, Loire R, Bosshard S, Guernou M, et al. Pathological features of temporal arteries in patients with giant cell arteritis presenting with permanent visual loss. *Ann Rheum Dis* 2009;68:84-8.
182. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009;361:888-98.
183. Samson M, Lakomy D, Audia S, Bonnotte B. [T(H)17 lymphocytes: induction, phenotype, functions, and implications in human disease and therapy]. *Rev Med Interne* 2011;32:292-301.
184. Nadkarni S, Dalli J, Hollywood J, Mason JC, Dasgupta B, Perretti M. Investigational analysis reveals a potential role for neutrophils in giant-cell arteritis disease progression. *Circ Res* 2014;114:242-8.
185. Bigas A, Espinosa L. Hematopoietic stem cells: to be or Notch to be. *Blood* 2012;119:3226-35.
186. Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:678-89.
187. Boucher J, Gridley T, Liaw L. Molecular pathways of notch signaling in vascular smooth muscle cells. *Front Physiol* 2012;3:81.
188. Piggott K, Deng J, Warrington K, Younge B, Kubo JT, Desai M, et al. Blocking the NOTCH pathway inhibits vascular inflammation in large-vessel vasculitis. *Circulation* 2011;123:309-18.
189. Yang K, Proweller A. Vascular smooth muscle Notch signals regulate endothelial cell sensitivity to angiogenic stimulation. *J Biol Chem* 2011;286:13741-53.
190. Koyanagi A, Sekine C, Yagita H. Expression of Notch receptors and ligands on immature and mature T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;418:799-805.
191. Mohan SV, Liao YJ, Kim JW, Goronzy JJ, Weyand CM. Giant cell arteritis: immune and vascular aging as disease risk factors. *Arthritis Res Ther* 2011;13:231.
192. Czesnikiewicz-Guzik M, Lee WW, Cui D, Hiruma Y, Lamar DL, Yang ZZ, et al. T cell subset-specific susceptibility to aging. *Clin Immunol* 2008;127:107-18.
193. Goronzy JJ, Fulbright JW, Crowson CS, Poland GA, O'Fallon WM, Weyand CM. Value of immunological markers in predicting responsiveness to influenza vaccination in elderly individuals. *J Virol* 2001;75:12182-7.
194. Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ. T-cell senescence: a culprit of immune abnormalities in chronic inflammation and persistent infection. *Trends Mol Med* 2004;10:119-24.
195. Weyand CM, Fujii H, Shao L, Goronzy JJ. Rejuvenating the immune system in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2009;5:583-8.
196. Grolleau-Julius A, Harning EK, Abernathy LM, Yung RL. Impaired dendritic cell function in aging leads to defective antitumor immunity. *Cancer Res* 2008;68:6341-9.
197. Panda A, Qian F, Mohanty S, van Duin D, Newman FK, Zhang L, et al. Age-associated decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts influenza vaccine response. *J Immunol* 2010;184:2518-27.
198. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:729-40.
199. Lee HY, Oh BH. Aging and arterial stiffness. *Circ J* 2010;74:2257-62.
200. Li M, Fukagawa NK. Age-related changes in redox signaling and VSMC function. *Antioxid Redox Signal* 2010;12:641-55.
201. Sawabe M. Vascular aging: from molecular mechanism to clinical significance. *Geriatr Gerontol Int* 2010;10 Suppl 1:S213-20.
202. Wang M, Monticone RE, Lakatta EG. Arterial aging: a journey into subclinical arterial disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010;19:201-7.
203. Annunziato F, Romagnani S. Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Res Ther* 2009;11:257.
204. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004;351:2715-29.

- 205.** Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-57.
- 206.** Del Prete GF, De Carli M, Mastromauro C, Biagiotti R, Macchia D, Falagiani P, et al. Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest* 1991;88:346-50.
- 207.** Parronchi P, Macchia D, Piccinni MP, Biswas P, Simonelli C, Maggi E, et al. Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:4538-42.
- 208.** Romagnani S. Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response? *Immunol Today* 1992;13:379-81.
- 209.** Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 1997;185:817-24.
- 210.** Okazawa A, Kanai T, Watanabe M, Yamazaki M, Inoue N, Ikeda M, et al. Th1-mediated intestinal inflammation in Crohn's disease may be induced by activation of lamina propria lymphocytes through synergistic stimulation of interleukin-12 and interleukin-18 without T cell receptor engagement. *Am J Gastroenterol* 2002;97:3108-17.
- 211.** Smeltz RB, Chen J, Ehrhardt R, Shevach EM. Role of IFN-gamma in Th1 differentiation: IFN-gamma regulates IL-18R alpha expression by preventing the negative effects of IL-4 and by inducing/maintaining IL-12 receptor beta 2 expression. *J Immunol* 2002;168:6165-72.
- 212.** Liotta F, Frosali F, Querci V, Mantei A, Fili L, Maggi L, et al. Human immature myeloid dendritic cells trigger a TH2-polarizing program via Jagged-1/Notch interaction. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1000-5 e8.
- 213.** Amsen D, Antov A, Jankovic D, Sher A, Radtke F, Souabni A, et al. Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. *Immunity* 2007;27:89-99.
- 214.** Amsen D, Blander JM, Lee GR, Tanigaki K, Honjo T, Flavell RA. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 2004;117:515-26.
- 215.** Fallon PG, Ballantyne SJ, Mangan NE, Barlow JL, Dasvarma A, Hewett DR, et al. Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *J Exp Med* 2006;203:1105-16.
- 216.** Owyang AM, Zaph C, Wilson EH, Guild KJ, McClanahan T, Miller HR, et al. Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2006;203:843-9.
- 217.** Siracusa MC, Comeau MR, Artis D. New insights into basophil biology: initiators, regulators, and effectors of type 2 inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1217:166-77.
- 218.** Nakanishi K. Basophils are potent antigen-presenting cells that selectively induce Th2 cells. *Eur J Immunol* 2010;40:1836-42.
- 219.** Yoshimoto T, Yasuda K, Tanaka H, Nakahira M, Imai Y, Fujimori Y, et al. Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2009;10:706-12.
- 220.** Sokol CL, Chu NQ, Yu S, Nish SA, Laufer TM, Medzhitov R. Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat Immunol* 2009;10:713-20.
- 221.** Perrigoue JG, Saenz SA, Siracusa MC, Allenspach EJ, Taylor BC, Giacomini PR, et al. MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity. *Nat Immunol* 2009;10:697-705.
- 222.** Zhu J, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity* 2003;19:739-48.

- 223.** Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res* 2006;16:3-10.
- 224.** Romagnani S. Biology of human TH1 and TH2 cells. *J Clin Immunol* 1995;15:121-9.
- 225.** Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Kohler G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 1993;362:245-8.
- 226.** Coffman RL, Seymour BW, Hudak S, Jackson J, Rennick D. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* 1989;245:308-10.
- 227.** Longphre M, Li D, Gallup M, Drori E, Ordonez CL, Redman T, et al. Allergen-induced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 1999;104:1375-82.
- 228.** Romagnani S. The role of lymphocytes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:399-408.
- 229.** Zhu J, Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* 2010;20:4-12.
- 230.** Usui T, Nishikomori R, Kitani A, Strober W. GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity* 2003;18:415-28.
- 231.** Usui T, Preiss JC, Kanno Y, Yao ZJ, Bream JH, O'Shea JJ, et al. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *J Exp Med* 2006;203:755-66.
- 232.** Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123-32.
- 233.** Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005;6:1133-41.
- 234.** Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, et al. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1999;42:963-70.
- 235.** Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 2009;129:1339-50.
- 236.** Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003;52:65-70.
- 237.** Miossec P. IL-17 in rheumatoid arthritis: a new target for treatment or just another cytokine? *Joint Bone Spine* 2004;71:87-90.
- 238.** Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 2008;223:87-113.
- 239.** Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007;8:950-7.
- 240.** Cooper SM, Sriram S, Ranges GE. Suppression of murine collagen-induced arthritis with monoclonal anti-Ia antibodies and augmentation with IFN-gamma. *J Immunol* 1988;141:1958-62.
- 241.** Mauritz NJ, Holmdahl R, Jonsson R, Van der Meide PH, Scheynius A, Klareskog L. Treatment with gamma-interferon triggers the onset of collagen arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 1988;31:1297-304.
- 242.** Manoury-Schwartz B, Chiocchia G, Bessis N, Abehsira-Amar O, Batteux F, Muller S, et al. High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors. *J Immunol* 1997;158:5501-6.
- 243.** Vermeire K, Heremans H, Vandeputte M, Huang S, Billiau A, Matthys P. Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol* 1997;158:5507-13.
- 244.** Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 2006;116:1218-22.



- 245.** Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003;198:1951-7.
- 246.** Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006;24:179-89.
- 247.** Gutcher I, Urich E, Wolter K, Prinz M, Becher B. Interleukin 18-independent engagement of interleukin 18 receptor-alpha is required for autoimmune inflammation. *Nat Immunol* 2006;7:946-53.
- 248.** Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235-8.
- 249.** Gutcher I, Donkor MK, Ma Q, Rudensky AY, Flavell RA, Li MO. Autocrine transforming growth factor-beta1 promotes in vivo Th17 cell differentiation. *Immunity* 2011;34:396-408.
- 250.** Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, Strom TB, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 2007;448:484-7.
- 251.** Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:485-517.
- 252.** Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV, Bayry J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol* 2012;181:8-18.
- 253.** Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 2007;448:480-3.
- 254.** Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007;8:967-74.
- 255.** Miossec P. Interleukin-17 in fashion, at last: ten years after its description, its cellular source has been identified. *Arthritis Rheum* 2007;56:2111-5.
- 256.** Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 2008;454:350-2.
- 257.** Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* 2010;467:967-71.
- 258.** Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. Defining the human T helper 17 cell phenotype. *Trends Immunol* 2012;33:505-12.
- 259.** Chen Z, Laurence A, O'Shea JJ. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol* 2007;19:400-8.
- 260.** Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 2007;26:371-81.
- 261.** Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 2007;8:942-9.
- 262.** Chen Z, Tato CM, Muul L, Laurence A, O'Shea JJ. Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. *Arthritis Rheum* 2007;56:2936-46.
- 263.** Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. *Nat Immunol* 2008;9:641-9.
- 264.** Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupe P, Barillot E, et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol* 2008;9:650-7.

- 265.** Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, et al. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med* 2008;205:1903-16.
- 266.** Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, Querci V, De Palma R, et al. TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *Eur J Immunol* 2009;39:207-15.
- 267.** Holland SM, DeLeo FR, Elloumi HZ, Hsu AP, Uzel G, Brodsky N, et al. STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome. *N Engl J Med* 2007;357:1608-19.
- 268.** Milner JD, Brechley JM, Laurence A, Freeman AF, Hill BJ, Elias KM, et al. Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature* 2008;452:773-6.
- 269.** Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007;204:1849-61.
- 270.** Lanier LL, Chang C, Phillips JH. Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J Immunol* 1994;153:2417-28.
- 271.** Fogal B, Yi T, Wang C, Rao DA, Lebastchi A, Kulkarni S, et al. Neutralizing IL-6 reduces human arterial allograft rejection by allowing emergence of CD161+ CD4+ regulatory T cells. *J Immunol* 2011;187:6268-80.
- 272.** Cosmi L, Cimaz R, Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Borriello F, et al. Evidence of the transient nature of the Th17 phenotype of CD4+CD161+ T cells in the synovial fluid of patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2011;63:2504-15.
- 273.** Ishihara S, Nieda M, Kitayama J, Osada T, Yabe T, Ishikawa Y, et al. CD8(+)NKR-P1A (+)T cells preferentially accumulate in human liver. *Eur J Immunol* 1999;29:2406-13.
- 274.** Kleinschek MA, Boniface K, Sadekova S, Grein J, Murphy EE, Turner SP, et al. Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *J Exp Med* 2009;206:525-34.
- 275.** Poggi A, Costa P, Zocchi MR, Moretta L. Phenotypic and functional analysis of CD4+ NKR-P1A+ human T lymphocytes. Direct evidence that the NKR-P1A molecule is involved in transendothelial migration. *Eur J Immunol* 1997;27:2345-50.
- 276.** Rosen DB, Cao W, Avery DT, Tangye SG, Liu YJ, Houchins JP, et al. Functional consequences of interactions between human NKR-P1A and its ligand LLT1 expressed on activated dendritic cells and B cells. *J Immunol* 2008;180:6508-17.
- 277.** Aldemir H, Prod'homme V, Dumaourier MJ, Retiere C, Poupon G, Cazareth J, et al. Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor. *J Immunol* 2005;175:7791-5.
- 278.** Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Querci V, Beltrame L, Cavalieri D, et al. Rarity of human T helper 17 cells is due to retinoic acid orphan receptor-dependent mechanisms that limit their expansion. *Immunity* 2012;36:201-14.
- 279.** LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, Osorio F, Slack EC, Tsoni SV, et al. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* 2007;8:630-8.
- 280.** van Beelen AJ, Zelinkova Z, Taanman-Kueter EW, Muller FJ, Hommes DW, Zaat SA, et al. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* 2007;27:660-9.
- 281.** Batten M, Li J, Yi S, Kljavin NM, Danilenko DM, Lucas S, et al. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 2006;7:929-36.
- 282.** Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM, et al. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* 2006;7:937-45.
- 283.** Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 2007;204:1757-64.

- 284.** Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008;453:1051-7.
- 285.** Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004;21:467-76.
- 286.** Fouser LA, Wright JF, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M. Th17 cytokines and their emerging roles in inflammation and autoimmunity. *Immunol Rev* 2008;226:87-102.
- 287.** Starnes T, Robertson MJ, Sledge G, Kelich S, Nakshatri H, Broxmeyer HE, et al. Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. *J Immunol* 2001;167:4137-40.
- 288.** Hsu HC, Yang P, Wang J, Wu Q, Myers R, Chen J, et al. Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat Immunol* 2008;9:166-75.
- 289.** Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 2008;14:275-81.
- 290.** Ma CS, Chew GY, Simpson N, Priyadarshi A, Wong M, Grimbacher B, et al. Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3. *J Exp Med* 2008;205:1551-7.
- 291.** Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol* 2008;9:1347-55.
- 292.** Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmbj H, Westendorf A, Buer J, et al. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* 2008;9:1341-6.
- 293.** Gessner A, Blum H, Rollinghoff M. Differential regulation of IL-9-expression after infection with *Leishmania major* in susceptible and resistant mice. *Immunobiology* 1993;189:419-35.
- 294.** Elyaman W, Bradshaw EM, Uyttenhove C, Dardalhon V, Awasthi A, Imitola J, et al. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:12885-90.
- 295.** Nowak EC, Weaver CT, Turner H, Begum-Haque S, Becher B, Schreiner B, et al. IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *J Exp Med* 2009;206:1653-60.
- 296.** Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 2007;8:639-46.
- 297.** Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 2009;10:857-63.
- 298.** Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol* 2009;10:864-71.
- 299.** Yang X, Zheng SG. Interleukin-22: a likely target for treatment of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2014;13:615-20.
- 300.** Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133:775-87.
- 301.** Khattry R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003;4:337-42.
- 302.** Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330-6.
- 303.** Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-61.
- 304.** Langier S, Sade K, Kivity S. Regulatory T cells: the suppressor arm of the immune system. *Autoimmun Rev* 2010;10:112-5.

- 305.** Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* 2007;13:108-16.
- 306.** Novak J, Lehen A. Mechanism of regulation of autoimmunity by iNKT cells. *Cytokine* 2011;53:263-70.
- 307.** Dinesh RK, Skaggs BJ, La Cava A, Hahn BH, Singh RP. CD8+ Tregs in lupus, autoimmunity, and beyond. *Autoimmun Rev* 2010;9:560-8.
- 308.** Jiang H, Chess L. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med* 2006;354:1166-76.
- 309.** Miyara M, Gorochoy G, Ehrenstein M, Musset L, Sakaguchi S, Amoura Z. Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2011;10:744-55.
- 310.** Ng WF, Duggan PJ, Ponchel F, Matarese G, Lombardi G, Edwards AD, et al. Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 2001;98:2736-44.
- 311.** Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001;167:1245-53.
- 312.** Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001;193:1303-10.
- 313.** Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* 2001;193:1295-302.
- 314.** Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001;193:1285-94.
- 315.** Taams LS, Smith J, Rustin MH, Salmon M, Poulter LW, Akbar AN. Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol* 2001;31:1122-31.
- 316.** Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 2006;126:375-87.
- 317.** Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:5138-43.
- 318.** Brandenburg S, Takahashi T, de la Rosa M, Janke M, Karsten G, Muzzulini T, et al. IL-2 induces in vivo suppression by CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2008;38:1643-53.
- 319.** de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 2004;34:2480-8.
- 320.** Antony PA, Paulos CM, Ahmadzadeh M, Akpinarli A, Palmer DC, Sato N, et al. Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo. *J Immunol* 2006;176:5255-66.
- 321.** Sharfe N, Dadi HK, Shahar M, Roifman CM. Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3168-71.
- 322.** Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med* 2005;201:723-35.
- 323.** Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2007;8:1353-62.
- 324.** Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998;188:287-96.
- 325.** Scheffold A, Huhn J, Hofer T. Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: it takes (IL-)two to tango. *Eur J Immunol* 2005;35:1336-41.

- 326.** Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 2004;16:1643-56.
- 327.** Pillai V, Ortega SB, Wang CK, Karandikar NJ. Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells. *Clin Immunol* 2007;123:18-29.
- 328.** Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, Heemskerk B, Schilham MW, Hartgers FC, et al. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol* 2005;66:13-20.
- 329.** Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006;203:1693-700.
- 330.** Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006;203:1701-11.
- 331.** Manzotti CN, Tipping H, Perry LC, Mead KI, Blair PJ, Zheng Y, et al. Inhibition of human T cell proliferation by CTLA-4 utilizes CD80 and requires CD25+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2002;32:2888-96.
- 332.** Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002;3:135-42.
- 333.** Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 2007;110:1225-32.
- 334.** Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007;204:1257-65.
- 335.** Beriou G, Costantino CM, Ashley CW, Yang L, Kuchroo VK, Baecher-Allan C, et al. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. *Blood* 2009;113:4240-9.
- 336.** Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004;21:503-13.
- 337.** Valmori D, Merlo A, Souleimanian NE, Hesdorffer CS, Ayyoub M. A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. *J Clin Invest* 2005;115:1953-62.
- 338.** Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4+ CD25+ T cells. *Clin Immunol* 2005;115:10-8.
- 339.** Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001;194:629-44.
- 340.** Ralainirina N, Poli A, Michel T, Poos L, Andres E, Hentges F, et al. Control of NK cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 2007;81:144-53.
- 341.** Romagnani C, Della Chiesa M, Kohler S, Moewes B, Radbruch A, Moretta L, et al. Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4+ T helper cells and CD4+ CD25hi T regulatory cells. *Eur J Immunol* 2005;35:2452-8.
- 342.** Trzonkowski P, Szmit E, Mysliwska J, Dobyszek A, Mysliwski A. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. *Clin Immunol* 2004;112:258-67.
- 343.** Huber S, Schramm C, Lehr HA, Mann A, Schmitt S, Becker C, et al. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 2004;173:6526-31.
- 344.** Collins M, Ling V, Carreno BM. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol* 2005;6:223.
- 345.** Ito T, Hanabuchi S, Wang YH, Park WR, Arima K, Bover L, et al. Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* 2008;28:870-80.

- 346.** Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup> T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009;30:899-911.
- 347.** Tchilian EZ, Beverley PC. Altered CD45 expression and disease. *Trends Immunol* 2006;27:146-53.
- 348.** Verhagen J, Wraith DC. Comment on "Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells". *J Immunol* 2010;185:7129; author reply 30.
- 349.** Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells. *J Immunol* 2010;184:3433-41.
- 350.** Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000;164:183-90.
- 351.** Askenasy N, Kaminitz A, Yarkoni S. Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun Rev* 2008;7:370-5.
- 352.** Lim HW, Hilsamer P, Banham AH, Kim CH. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* 2005;175:4180-3.
- 353.** Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8<sup>+</sup> T cell activation by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory cells. *J Immunol* 2001;167:1137-40.
- 354.** Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 2004;172:4676-80.
- 355.** Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:1206-12.
- 356.** Lewkowicz P, Lewkowicz N, Sasiak A, Tchorzewski H. Lipopolysaccharide-activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. *J Immunol* 2006;177:7155-63.
- 357.** Yi H, Zhen Y, Jiang L, Zheng J, Zhao Y. The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *Cell Mol Immunol* 2006;3:189-95.
- 358.** Collison LW, Pillai MR, Chaturvedi V, Vignali DA. Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *J Immunol* 2009;182:6121-8.
- 359.** Bardel E, Larousserie F, Charlot-Rabiega P, Coulomb-L'Hermine A, Devergne O. Human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J Immunol* 2008;181:6898-905.
- 360.** Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001;27:68-73.
- 361.** van der Vliet HJ, Nieuwenhuis EE. IPEX as a result of mutations in FOXP3. *Clin Dev Immunol* 2007;2007:89017.
- 362.** Cao D, Malmstrom V, Baecher-Allan C, Hafler D, Klareskog L, Trollmo C. Isolation and functional characterization of regulatory CD25<sup>bright</sup>CD4<sup>+</sup> T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 2003;33:215-23.
- 363.** Peck A, Mellins ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology* 2010;129:147-53.
- 364.** Kleinewietfeld M, Hafler DA. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol* 2013;25:305-12.
- 365.** O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4<sup>+</sup> T cells. *Science* 2010;327:1098-102.
- 366.** Fernandez-Fernandez FJ. Treg cells in giant cell arteritis: might they be another target for adjuvant treatment? Comment on the article by Samson et al. *Arthritis Rheum* 2013;65:289.
- 367.** Zold E, Szodoray P, Nakken B, Barath S, Kappelmayer J, Csathy L, et al. Alfacalcidol treatment restores derailed immune-regulation in patients with undifferentiated connective tissue disease. *Autoimmun Rev* 2011;10:155-62.

- 368.** Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol* 2009;183:5458-67.
- 369.** Corbera-Bellalta M, Planas-Rigol E, Espigol-Frigole G, Lozano E, Cid MC. Functionally relevant treg cells are present in giant cell arteritis lesions: comment on the article by Samson et al. *Arthritis Rheum* 2013;65:1133-4.
- 370.** Espigol-Frigole G, Corbera-Bellalta M, Planas-Rigol E, Lozano E, Segarra M, Garcia-Martinez A, et al. Increased IL-17A expression in temporal artery lesions is a predictor of sustained response to glucocorticoid treatment in patients with giant-cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2012.
- 371.** Lochner M, Peduto L, Cherrier M, Sawa S, Langa F, Varona R, et al. In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgamma t+ T cells. *J Exp Med* 2008;205:1381-93.
- 372.** McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, et al. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 2007;8:1390-7.
- 373.** Field M, Cook A, Gallagher G. Immuno-localisation of tumour necrosis factor and its receptors in temporal arteritis. *Rheumatol Int* 1997;17:113-8.
- 374.** Noack M, Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev* 2014;13:668-77.
- 375.** McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011;365:2205-19.
- 376.** Guillemin F, Saraux A, Guggenbuhl P, Roux CH, Fardellone P, Le Bihan E, et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in France: 2001. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1427-30.
- 377.** Sany J. La polyarthrite rhumatoïde de l'adulte; 2003.
- 378.** Bush KA, Farmer KM, Walker JS, Kirkham BW. Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein. *Arthritis Rheum* 2002;46:802-5.
- 379.** Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Joosten LA, et al. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum* 2004;50:650-9.
- 380.** Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 2003;171:6173-7.
- 381.** Kirkham BW, Lassere MN, Edmonds JP, Juhasz KM, Bird PA, Lee CS, et al. Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). *Arthritis Rheum* 2006;54:1122-31.
- 382.** Lundy SK, Sarkar S, Tesmer LA, Fox DA. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis Res Ther* 2007;9:202.
- 383.** Kim KW, Cho ML, Kim HR, Ju JH, Park MK, Oh HJ, et al. Up-regulation of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) production in rheumatoid synovial fibroblasts through interactions with T lymphocytes: role of interleukin-17 and CD40L-CD40 interaction. *Arthritis Rheum* 2007;56:1076-86.
- 384.** Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 2006;203:2673-82.
- 385.** Chavele KM, Ehrenstein MR. Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *FEBS Lett* 2011;585:3603-10.
- 386.** Boissier MC, Assier E, Biton J, Denys A, Falgarone G, Bessis N. Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2009;76:10-4.
- 387.** Morgan ME, Suttmuller RP, Witteveen HJ, van Duivenvoorde LM, Zanelli E, Melief CJ, et al. CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1452-60.

388. Morgan ME, Flierman R, van Duivenvoorde LM, Witteveen HJ, van Ewijk W, van Laar JM, et al. Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells. *Arthritis Rheum* 2005;52:2212-21.
389. Nguyen LT, Jacobs J, Mathis D, Benoist C. Where FoxP3-dependent regulatory T cells impinge on the development of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:509-20.
390. Mottonen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomaki P, Luukkainen R, Lassila O. CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2005;140:360-7.
391. Lawson CA, Brown AK, Bejarano V, Douglas SH, Burgoyne CH, Greenstein AS, et al. Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4+CD25high regulatory T cell population in peripheral blood. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:1210-7.
392. Toubi E, Kessel A, Mahmudov Z, Hallas K, Rozenbaum M, Rosner I. Increased spontaneous apoptosis of CD4+CD25+ T cells in patients with active rheumatoid arthritis is reduced by infliximab. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1051:506-14.
393. Cao D, van Vollenhoven R, Klareskog L, Trollmo C, Malmstrom V. CD25brightCD4+ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Res Ther* 2004;6:R335-46.
394. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 2004;200:277-85.
395. Liu MF, Wang CR, Fung LL, Lin LH, Tsai CN. The presence of cytokine-suppressive CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 2005;62:312-7.
396. van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP, Taams LS. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum* 2004;50:2775-85.
397. Han GM, O'Neil-Andersen NJ, Zurier RB, Lawrence DA. CD4+CD25high T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol* 2008;253:92-101.
398. Flores-Borja F, Jury EC, Mauri C, Ehrenstein MR. Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:19396-401.
399. Han S, Li Y, Mao Y, Xie Y. Meta-analysis of the association of CTLA-4 exon-1 +49A/G polymorphism with rheumatoid arthritis. *Hum Genet* 2005;118:123-32.
400. Barreto M, Santos E, Ferreira R, Fesel C, Fontes MF, Pereira C, et al. Evidence for CTLA4 as a susceptibility gene for systemic lupus erythematosus. *Eur J Hum Genet* 2004;12:620-6.
401. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003;299:1033-6.
402. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood* 2006;108:253-61.
403. Lal G, Bromberg JS. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood* 2009;114:3727-35.
404. Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 2008;29:44-56.
405. Boissier MC, Assier E, Falgarone G, Bessis N. Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm. *Joint Bone Spine* 2008;75:373-5.
406. Alonzi T, Fattori E, Lazzaro D, Costa P, Probert L, Kollias G, et al. Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J Exp Med* 1998;187:461-8.
407. Takagi N, Mihara M, Moriya Y, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, et al. Blockage of interleukin-6 receptor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:2117-21.



- 408.** Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Azuma J, et al. Study of active controlled tocilizumab monotherapy for rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate (SATORI): significant reduction in disease activity and serum vascular endothelial growth factor by IL-6 receptor inhibition therapy. *Mod Rheumatol* 2009;19:12-9.
- 409.** Genovese MC, McKay JD, Nasonov EL, Mysler EF, da Silva NA, Alecock E, et al. Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in rheumatoid arthritis with inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs: the tocilizumab in combination with traditional disease-modifying antirheumatic drug therapy study. *Arthritis Rheum* 2008;58:2968-80.
- 410.** Smolen JS, Beaulieu A, Rubbert-Roth A, Ramos-Remus C, Rovensky J, Alecock E, et al. Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet* 2008;371:987-97.
- 411.** Ito H. Treatment of Crohn's disease with anti-IL-6 receptor antibody. *J Gastroenterol* 2005;40 Suppl 16:32-4.
- 412.** Madhok R, Crilly A, Watson J, Capell HA. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. *Ann Rheum Dis* 1993;52:232-4.
- 413.** Weyand CM, Fulbright JW, Hunder GG, Evans JM, Goronzy JJ. Treatment of giant cell arteritis: interleukin-6 as a biologic marker of disease activity. *Arthritis Rheum* 2000;43:1041-8.
- 414.** de Kleer IM, Wedderburn LR, Taams LS, Patel A, Varsani H, Klein M, et al. CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J Immunol* 2004;172:6435-43.
- 415.** Yue C, You X, Zhao L, Wang H, Tang F, Zhang F, et al. The effects of adalimumab and methotrexate treatment on peripheral Th17 cells and IL-17/IL-6 secretion in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int* 2010;30:1553-7.
- 416.** Aravena O, Pesce B, Soto L, Orrego N, Sabugo F, Wurmman P, et al. Anti-TNF therapy in patients with rheumatoid arthritis decreases Th1 and Th17 cell populations and expands IFN-gamma-producing NK cell and regulatory T cell subsets. *Immunobiology* 2011;216:1256-63.
- 417.** McGovern JL, Nguyen DX, Notley CA, Mauri C, Isenberg DA, Ehrenstein MR. Th17 cells are restrained by Treg cells via the inhibition of interleukin-6 in patients with rheumatoid arthritis responding to anti-tumor necrosis factor antibody therapy. *Arthritis Rheum* 2012;64:3129-38.
- 418.** Thiolat A, Semerano L, Pers YM, Biton J, Lemeiter D, Portales P, et al. Interleukin-6 receptor blockade enhances CD39+ regulatory T cell development in rheumatoid arthritis and in experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:273-83.
- 419.** van Gestel AM, Prevoo ML, van 't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB, van Riel PL. Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary American College of Rheumatology and the World Health Organization/International League Against Rheumatism Criteria. *Arthritis Rheum* 1996;39:34-40.
- 420.** Samson M, Audia S, Janikashvili N, Ciudad M, Trad M, Fraszczak J, et al. Brief report: inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg cell imbalance in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2012;64:2499-503.
- 421.** Pesce B, Soto L, Sabugo F, Wurmman P, Cuchacovich M, Lopez MN, et al. Effect of interleukin-6 receptor blockade on the balance between regulatory T cells and T helper type 17 cells in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Immunol* 2013;171:237-42.
- 422.** Miyao T, Floess S, Setoguchi R, Luche H, Fehling HJ, Waldmann H, et al. Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity* 2012;36:262-75.

423. Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Nakashima T, Oh-hora M, Kodama T, et al. Pathogenic conversion of Foxp3<sup>+</sup> T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med* 2014;20:62-8.
424. Brandes M, Willimann K, Bioley G, Levy N, Eberl M, Luo M, et al. Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8<sup>+</sup> alphabeta T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:2307-12.
425. Carvalheiro H, da Silva JA, Souto-Carneiro MM. Potential roles for CD8(+) T cells in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2013;12:401-9.
426. Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 2009;9:833-44.
427. Weinreich MA, Hogquist KA. Thymic emigration: when and how T cells leave home. *J Immunol* 2008;181:2265-70.
428. Kaech SM, Ahmed R. Memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* 2001;2:415-22.
429. Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, Konieczny BT, Surh CD, Ahmed R. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* 2003;4:1191-8.
430. Tomiyama H, Matsuda T, Takiguchi M. Differentiation of human CD8(+) T cells from a memory to memory/effector phenotype. *J Immunol* 2002;168:5538-50.
431. Tomiyama H, Takata H, Matsuda T, Takiguchi M. Phenotypic classification of human CD8<sup>+</sup> T cells reflecting their function: inverse correlation between quantitative expression of CD27 and cytotoxic effector function. *Eur J Immunol* 2004;34:999-1010.
432. Gravano DM, Hoyer KK. Promotion and prevention of autoimmune disease by CD8<sup>+</sup> T cells. *J Autoimmun* 2013;45:68-79.
433. Murphy K, Travers P, Walport M. *Immunobiology*. Seventh Edition ed; 2008.
434. Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2002;2:401-9.
435. Mosmann TR, Li L, Sad S. Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. *Semin Immunol* 1997;9:87-92.
436. Vukmanovic-Stejić M, Vyas B, Gorak-Stolinska P, Noble A, Kemeny DM. Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood* 2000;95:231-40.
437. Kondo T, Takata H, Matsuki F, Takiguchi M. Cutting edge: Phenotypic characterization and differentiation of human CD8<sup>+</sup> T cells producing IL-17. *J Immunol* 2009;182:1794-8.
438. Tajima M, Wakita D, Satoh T, Kitamura H, Nishimura T. IL-17/IFN-gamma double producing CD8<sup>+</sup> T (Tc17/IFN-gamma) cells: a novel cytotoxic T-cell subset converted from Tc17 cells by IL-12. *Int Immunol* 2011;23:751-9.
439. Henriques A, Ines L, Couto M, Pedreiro S, Santos C, Magalhaes M, et al. Frequency and functional activity of Th17, Tc17 and other T-cell subsets in Systemic Lupus Erythematosus. *Cell Immunol* 2010;264:97-103.
440. Hu Y, Ma DX, Shan NN, Zhu YY, Liu XG, Zhang L, et al. Increased number of Tc17 and correlation with Th17 cells in patients with immune thrombocytopenia. *PLoS One* 2011;6:e26522.
441. Yeh N, Glosson NL, Wang N, Guindon L, McKinley C, Hamada H, et al. Tc17 cells are capable of mediating immunity to vaccinia virus by acquisition of a cytotoxic phenotype. *J Immunol* 2010;185:2089-98.
442. Hamada H, Garcia-Hernandez Mde L, Reome JB, Misra SK, Strutt TM, McKinstry KK, et al. Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *J Immunol* 2009;182:3469-81.
443. Wang YM, Alexander SI. CD8 regulatory T cells: what's old is now new. *Immunol Cell Biol* 2009;87:192-3.
444. Konya C, Goronzy JJ, Weyand CM. Treating autoimmune disease by targeting CD8(+) T suppressor cells. *Expert Opin Biol Ther* 2009;9:951-65.

445. Annibali V, Ristori G, Angelini DF, Serafini B, Mechelli R, Cannoni S, et al. CD161(high)CD8+ T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis. *Brain* 2011;134:542-54.
446. Wang B, Gonzalez A, Benoist C, Mathis D. The role of CD8+ T cells in the initiation of insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* 1996;26:1762-9.
447. van den Boorn JG, Konijnenberg D, Dellemijn TA, van der Veen JP, Bos JD, Melief CJ, et al. Autoimmune destruction of skin melanocytes by perilesional T cells from vitiligo patients. *J Invest Dermatol* 2009;129:2220-32.
448. Olsson B, Jernas M, Wadenvik H. Increased plasma levels of granzymes in adult patients with chronic immune thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 2012;107:1182-4.
449. Zhao C, Li X, Zhang F, Wang L, Peng J, Hou M. Increased cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytotoxicity predominant in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura without platelet autoantibodies. *Haematologica* 2008;93:1428-30.
450. Zhang F, Chu X, Wang L, Zhu Y, Li L, Ma D, et al. Cell-mediated lysis of autologous platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 2006;76:427-31.
451. Olsson B, Andersson PO, Jernas M, Jacobsson S, Carlsson B, Carlsson LM, et al. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nat Med* 2003;9:1123-4.
452. Audia S, Samson M, Mahevas M, Ferrand C, Trad M, Ciudad M, et al. Preferential splenic CD8(+) T-cell activation in rituximab-nonresponder patients with immune thrombocytopenia. *Blood* 2013;122:2477-86.
453. Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 2000;192:393-404.
454. Jacobsen M, Cepok S, Quak E, Happel M, Gaber R, Ziegler A, et al. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain* 2002;125:538-50.
455. Comi C, Fleetwood T, Dianzani U. The role of T cell apoptosis in nervous system autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2012;12:150-6.
456. Neidhart M, Fehr K, Pataki F, Michel BA. The levels of memory (CD45RA-, RO+) CD4+ and CD8+ peripheral blood T-lymphocytes correlate with IgM rheumatoid factors in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 1996;15:201-9.
457. Hall FC, Thomson K, Procter J, McMichael AJ, Wordsworth BP. TCR beta spectratyping in RA: evidence of clonal expansions in peripheral blood lymphocytes. *Ann Rheum Dis* 1998;57:319-22.
458. Fitzgerald JE, Ricalton NS, Meyer AC, West SG, Kaplan H, Behrendt C, et al. Analysis of clonal CD8+ T cell expansions in normal individuals and patients with rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1995;154:3538-47.
459. DerSimonian H, Sugita M, Glass DN, Maier AL, Weinblatt ME, Reme T, et al. Clonal V alpha 12.1+ T cell expansions in the peripheral blood of rheumatoid arthritis patients. *J Exp Med* 1993;177:1623-31.
460. Afeltra A, Galeazzi M, Sebastiani GD, Ferri GM, Caccavo D, Addessi MA, et al. Coexpression of CD69 and HLADR activation markers on synovial fluid T lymphocytes of patients affected by rheumatoid arthritis: a three-colour cytometric analysis. *Int J Exp Pathol* 1997;78:331-6.
461. Klatt T, Ouyang Q, Flad T, Koetter I, Buhning HJ, Kalbacher H, et al. Expansion of peripheral CD8+ CD28- T cells in response to Epstein-Barr virus in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2005;32:239-51.
462. Fazou C, Yang H, McMichael AJ, Callan MF. Epitope specificity of clonally expanded populations of CD8+ T cells found within the joints of patients with inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2001;44:2038-45.
463. Tan LC, Mowat AG, Fazou C, Rostron T, Roskell H, Dunbar PR, et al. Specificity of T cells in synovial fluid: high frequencies of CD8(+) T cells that are specific for certain viral epitopes. *Arthritis Res* 2000;2:154-64.

464. Berthelot JM, Saulquin X, Coste-Burel M, Peyrat MA, Echasserieu K, Bonneville M, et al. Search for correlation of CD8 T cell response to Epstein-Barr virus with clinical status in rheumatoid arthritis: a 15 month followup pilot study. *J Rheumatol* 2003;30:1673-9.
465. Wagner UG, Kurtin PJ, Wahner A, Brackertz M, Berry DJ, Goronzy JJ, et al. The role of CD8+ CD40L+ T cells in the formation of germinal centers in rheumatoid synovitis. *J Immunol* 1998;161:6390-7.
466. Kang YM, Zhang X, Wagner UG, Yang H, Beckenbaugh RD, Kurtin PJ, et al. CD8 T cells are required for the formation of ectopic germinal centers in rheumatoid synovitis. *J Exp Med* 2002;195:1325-36.
467. Macchioni P, Boiardi L, Salvarani C, Rossi F, Casadei-Maldini M, Mancini R, et al. Lymphocyte subpopulations analysis in peripheral blood in polymyalgia rheumatica/giant cell arteritis. *Br J Rheumatol* 1993;32:666-70.
468. Elling P, Olsson AT, Elling H. A reduced CD8+ lymphocyte subset distinguishes patients with polymyalgia rheumatica and temporal arteritis from patients with other diseases. *Clin Exp Rheumatol* 1998;16:155-60.
469. Elling P, Olsson A, Elling H. CD8+ T lymphocyte subset in giant cell arteritis and related disorders. *J Rheumatol* 1990;17:225-7.
470. Elling H, Elling P. Decreased level of suppressor/cytotoxic T cells (OKT8+) in polymyalgia rheumatica and temporal arteritis: relation to disease activity. *J Rheumatol* 1985;12:306-9.
471. Dasgupta B, Duke O, Timms AM, Pitzalis C, Panayi GS. Selective depletion and activation of CD8+ lymphocytes from peripheral blood of patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 1989;48:307-11.
472. Benlahrache C, Segond P, Auquier L, Bouvet JP. Decrease of the OKT8 positive T cell subset in polymyalgia rheumatica. Lack of correlation with disease activity. *Arthritis Rheum* 1983;26:1472-80.
473. Elling H, Elling P, Olsson A. CD8+ lymphocyte subset in polymyalgia rheumatica and arteritis temporalis. Inverse relationship between the acute hepatic phase reactants and the CD8+ T-cell subset. *Clin Exp Rheumatol* 1989;7:627-30.
474. Elling P, Olsson AT, Elling H. Reduced CD8+ T-cell concentration in peripheral blood of patients with carotid artery stenosis: relation to arteritis temporalis. *Br J Rheumatol* 1996;35:649-51.
475. Salvarani C, Boiardi L, Macchioni P, Rossi F, Tartoni P, Casadei Maldini M, et al. Role of peripheral CD8 lymphocytes and soluble IL-2 receptor in predicting the duration of corticosteroid treatment in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 1995;54:640-4.
476. Antonelli A, Ferrari SM, Giuggioli D, Ferrannini E, Ferri C, Fallahi P. Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2014;13:272-80.
477. Muller M, Carter S, Hofer MJ, Campbell IL. Review: The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity--a tale of conflict and conundrum. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2010;36:368-87.
478. Lacotte S, Brun S, Muller S, Dumortier H. CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1173:310-7.
479. Nakajima C, Mukai T, Yamaguchi N, Morimoto Y, Park WR, Iwasaki M, et al. Induction of the chemokine receptor CXCR3 on TCR-stimulated T cells: dependence on the release from persistent TCR-triggering and requirement for IFN-gamma stimulation. *Eur J Immunol* 2002;32:1792-801.
480. Feng T, Qin H, Wang L, Benveniste EN, Elson CO, Cong Y. Th17 cells induce colitis and promote Th1 cell responses through IL-17 induction of innate IL-12 and IL-23 production. *J Immunol* 2011;186:6313-8.
481. Seror R, Baron G, Hachulla E, Debandt M, Larroche C, Puechal X, et al. Adalimumab for steroid sparing in patients with giant-cell arteritis: results of a multicentre randomised controlled trial. *Ann Rheum Dis* 2013.

# ***ANNEXES***

## LISTE DES ANNEXES

---

**Annexe 1 : *Stroke associated with giant-cell arteritis: a population-based study.***

M. Samson, A. Jacquin, S. Audia, B. Daubail, H. Devilliers, T. Petrella, L. Martin, J. Durier, J.-F. Besancenot, B. Lorcerie, M. Giroud, B. Bonnotte, Y. Béjot. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 2014.

**Annexe 2 : *Les lymphocytes Th17 : différenciation, phénotype, fonctions, et implications en pathologie et thérapeutique humaine.***

M. Samson, D. Lakomy, S. Audia, B. Bonnotte. *La revue de Médecine Interne*, 2011; 32 : 292-301.

**Annexe 3 : *Pathogénie de l'artérite à cellules géantes.***

M. Samson et B. Bonnotte. *La Presse Médicale*, 2012 ; 41 : 937-47.

**Annexe 4 : *Pathogenesis of giant cell arteritis: new insights into the implication of CD161<sup>+</sup> cells.***

M. Samson, S. Audia, L. Martin, N. Janikashvili, B. Bonnotte. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2013; 31: 65-73.

**Annexe 5 : *publications personnelles***

## RESEARCH PAPER

Stroke associated with giant cell arteritis:  
a population-based study

Maxime Samson,<sup>1,2,3</sup> Agnès Jacquin,<sup>4</sup> Sylvain Audia,<sup>1,2,3</sup> Benoit Daubail,<sup>4</sup>  
Hervé Devilliers,<sup>5</sup> Tony Petrella,<sup>6</sup> Laurent Martin,<sup>6</sup> Jérôme Durier,<sup>4</sup>  
Jean-François Besancenot,<sup>5</sup> Bernard Lorcerie,<sup>1</sup> Maurice Giroud,<sup>4</sup>  
Bernard Bonnotte,<sup>1,2,3</sup> Yannick Béjot<sup>4</sup>

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/jnnp-2014-307614>).

<sup>1</sup>Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, CHU de Dijon, Dijon, France

<sup>2</sup>INSERM, UMR1098, Besançon Cedex, France

<sup>3</sup>Faculté de Médecine, Université de Bourgogne, Dijon, France

<sup>4</sup>Dijon Stroke Registry, EA4184, Department of Neurology, University Hospital and Medical School of Dijon, University of Burgundy, France

<sup>5</sup>Service de Médecine Interne et maladies systémiques, CHU de Dijon, Dijon, France

<sup>6</sup>Service d'anatomie et cytologie pathologiques, CHU de Dijon, Dijon, France

**Correspondence to**

Dr Yannick Béjot, Dijon Stroke Registry, Department of neurology, CHU, 3 Rue du Faubourg Raines, Dijon 21000, France; [ybejot@yahoo.fr](mailto:ybejot@yahoo.fr)

Received 9 January 2014

Revised 18 February 2014

Accepted 1 April 2014

**ABSTRACT**

**Background** Giant cell arteritis (GCA) is the most common vasculitis in people  $\geq 50$  years and can be associated with stroke. We aimed to evaluate the epidemiology and characteristics of stroke in patients with GCA.

**Methods** All patients with a biopsy-proven diagnosis of GCA were identified among residents of the city of Dijon, France (152 000 inhabitants), between 2001 and 2012 using a prospective database. Among these, patients who suffered from stroke were retrieved by crossing data from the population-based Dijon Stroke Registry. Demographics and clinical features were recorded. We considered that the stroke was GCA-related if the stroke revealed GCA or occurred between the onset of symptoms and 4 weeks after the start of treatment.

**Results** Among the 57 biopsy-proven patients with GCA (incidence rate 10.9/100 000/year in individuals  $\geq 50$  years), 4 (7.0%) experienced a GCA-related stroke. Three were men and all had  $\geq 2$  vascular risk factors and were  $\geq 80$  years. The stroke was vertebrobasilar for 3/4 patients and undetermined for the remaining one. The incidence rate of GCA-related stroke in patients  $\geq 50$  years was 0.76/100 000/year (95% CI 0 to 2.47), 1.36/100 000/year in men (95% CI 0 to 3.63) and 0.33/100 000/year (95% CI 0 to 1.45) in women.

**Conclusions** This population-based study demonstrated that GCA-related stroke essentially affects the vertebrobasilar territory and mainly occurs in old men with associated vascular risk factors. Although rare, GCA symptoms must be searched for in elderly patients with stroke, and optimal vascular prevention must be conducted carefully in patients with GCA with a high vascular risk before initiating GCA treatment.

**INTRODUCTION**

Giant cell arteritis (GCA) is a granulomatous large vessel vasculitis that usually affects the aorta and/or its major branches, especially the branches of the carotid arteries. Due to the progressive aging of the population in Western countries, GCA has become the most common vasculitis in persons over 50 years of age. Peak incidence is observed in those aged between 70 and 80 years.<sup>1–3</sup> Histopathological lesions are observed in all layers of the artery and lead to segmental and focal panarteritis with a polymorphic cell infiltrate that includes T cells, macrophages and multinucleated giant cells, a fragmented

internal elastic lamina and intimal hyperplasia.<sup>4–5</sup> The pathophysiology of GCA is complex and not fully understood, but knowledge about the disease is improving.<sup>6–10</sup> In 27–56% of cases, GCA is associated with polymyalgia rheumatica (PMR), which has a common pathogenesis.<sup>12–9</sup>

In both PMR and GCA, systemic symptoms (fever, asthenia, anorexia and weight loss) are the consequence of chronic inflammation. However, the typical features of GCA result from the arterial topography of the inflammatory process, which involves vessel scarring and narrowing and eventually occlusion or severe stenosis. Vascular remodelling is responsible for ischaemic symptoms such as headache, scalp tenderness, jaw claudication, visual loss, scalp or tongue necrosis and also central nervous system ischaemic complications. Visual loss is usually caused by acute ischaemia of the optic nerve (AION), which is one of the most severe complications of GCA, occurring in about 30% of patients and leading to permanent loss of vision in 15% of cases.<sup>11–12</sup> Patients with GCA may also experience a stroke in the carotid or vertebrobasilar territories.<sup>13–14</sup> It usually occurs in the period of active disease and mainly affects the vertebrobasilar territory.<sup>15–16</sup> This topography of stroke is more common in patients with active GCA than in the general population of the same age.<sup>16</sup> Nevertheless, stroke remains an uncommon complication of GCA. It was observed in 2.8% of a large series of 287 biopsy-proven patients with GCA between the onset of symptoms and 4 weeks after the beginning of the treatment.<sup>15</sup> However, no population-based study is currently available to determine the exact incidence of stroke associated with GCA.

Therefore, based on data from the Dijon Stroke Registry, we aimed to evaluate the epidemiology and characteristics of stroke in patients with GCA.

**METHODS****Study population and case ascertainment**

So as to identify overall cases of stroke associated with GCA in a geographically defined area, this population-based study relied on crossing data prospectively obtained from two different databases.

**Ascertainment of cases of GCA**

Cases of GCA were identified using a database that collected all patients who underwent a temporal artery biopsy (TAB) between 1 January 2001 and

**To cite:** Samson M, Jacquin A, Audia S, et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* Published Online First: [please include Day Month Year] doi:10.1136/jnnp-2014-307614

## Cerebrovascular disease

31 December 2011 at the University Hospital of Dijon, France, and at one private practice of the city. These two centres are responsible for the management of all TABs performed in patients living in Dijon (2007 census: 151 543 inhabitants). TABs are routinely performed in all patients with clinical manifestations of GCA. The TAB was taken from the side where symptoms were predominant. When possible, the TAB was guided by Doppler sonography of the temporal artery. When clinical symptoms suggested GCA but the first TAB was negative, a second TAB could be performed but was not done in every case. Biopsies were also considered for patients with isolated PMR, even without specific manifestations of GCA, especially if general symptoms were severe and/or erythrocyte sedimentation rate (ESR)  $>50$  mm/h. The two pathology departments used a similar protocol for microscopic examination of TABs, by dividing the artery, when sufficiently long, into several segments of 2 mm, paraffin embedding and transverse cutting of 3–5 mm thick sections stained with H&E. TABs were then analysed by expert pathologists (LM and TP).

GCA was diagnosed in accordance with the American College of Rheumatology (ACR) criteria.<sup>17</sup> Patients included in this study were considered to have biopsy-proven GCA when the TAB showed a pathology compatible with the diagnosis of GCA: mononuclear cell infiltration of the arterial wall, with or without the presence of granulomas and/or multinucleated giant cells.<sup>2</sup>

### Ascertainment of stroke cases

All cases of stroke (including ischaemic stroke, spontaneous intracerebral haemorrhage and undetermined stroke) defined according to WHO recommendations<sup>18</sup> were identified among residents of the city of Dijon using the Dijon Stroke Registry. This population-based registry complies with the criteria recommended for the running of 'ideal' stroke incidence studies,<sup>19 20</sup> and case-collection procedures have been described elsewhere.<sup>21–23</sup> Briefly, so as to ensure the exhaustiveness of case ascertainment, multiple overlapping sources of information were used to identify fatal and non-fatal stroke in hospitalised and non-hospitalised patients: (1) a review of medical records from the emergency rooms, and all the clinical and radiological departments of Dijon University Hospital, with a diagnosis of stroke made by one of the neurologists of the department of neurology, where the Stroke Registry is located. (2) A review of medical records from the emergency rooms and all of the clinical departments of the three private hospitals of the city and its suburbs, with diagnosis made by neurologists working in these establishments. (3) A review of computerised hospital diagnostic codes of Dijon University Hospital. The International Classification of Diseases, tenth revision (ICD-10), was used. The following codes are initially searched for: I60 (subarachnoid haemorrhage), I61 (intracerebral haemorrhage), I62 (non-traumatic intracranial haemorrhage), I63 (ischaemic stroke), I64 (non-determined stroke), G45 (vascular syndromes), G46 (transient ischaemic attack) and G81 (hemiplegia). Study investigators then consulted the medical records of identified patients to confirm or not the reported diagnosis or to reclassify the patients if a misclassification was noted. (4) A review of computerised hospital diagnostic codes of the private hospitals with the same procedure as described above. (5) Collaboration with the general practitioners to identify patients with stroke managed at home or in nursing homes, with the diagnosis assessed by public or private neurologists from outpatient clinics. (6) A review of the medical records of patients identified from a computer-generated list of all requests for imaging to the

private radiological and Doppler ultrasound centres of the city and its suburbs. (7) Finally, regular checking of death certificates obtained from the local Social Security Bureau that is responsible for the registration of deaths in the community, particularly fatal strokes outside hospital. The quality and the completeness of the registry are certified every 4 years by an audit from the National Institute for Health and Medical Research and the National Public Health Institute. Ischaemic strokes were classified according to the trial of ORG 10172 in acute stroke treatment (TOAST) classification.

So as to identify potential cases of stroke preceding the diagnosis of GCA or occurring soon after, the Dijon Stroke Registry database was searched for stroke cases identified among patients with GCA between 1 January 1985 and 28 January 2012.

### Definition of GCA-related stroke

We considered that the stroke was GCA-related if it revealed GCA or if a stroke occurred between the onset of GCA symptoms and 4 weeks after the beginning of the treatment.<sup>15</sup>

### Data collected

The following vascular risk factors were systematically collected<sup>21–23</sup>: hypertension (high blood pressure noted in a patient's medical history or patients under antihypertensive treatment), diabetes mellitus (glucose level  $\geq 7.8$  mmol/L reported in the medical record or patients on insulin or oral hypoglycaemic agents), hypercholesterolaemia (total cholesterol level  $\geq 5.7$  mmol/L reported in the medical history or patients treated with lipid-lowering therapy), atrial fibrillation, history of coronary heart disease, heart failure, peripheral artery disease (PAD), alcohol intake ( $\geq 3$  units a day in men and  $\geq 2$  in women), smoking, cancer and previous stroke or transient ischaemic attack. Treatments prior to the stroke including antiplatelet agents, anticoagulants, antihypertensive treatments and statins were recorded. Clinical features at stroke onset were also reported. Data about the clinical characteristics of GCA and its treatment and outcome were retrospectively reviewed using medical charts.

### Statistical analysis

Proportions were compared using Fisher's exact test. Incidence rates were calculated using the average population of Dijon as denominators. These rates were age and sex adjusted to the 2006 European population using the direct method.<sup>24</sup> CIs for a Poisson distribution were calculated. *p* Values  $<0.05$  were considered statistically significant. STATA V.10.0 software (StataCorp LP, College Station, Texas, USA) was used for statistical analyses.

### Ethics

The Dijon Stroke Registry was approved by the National Ethics Committee and the French Institute for Public Health Surveillance.

### RESULTS

Between 1 January 2001 and 31 December 2011, a biopsy-proven diagnosis of GCA was made in 57 consecutive patients (39 females and 18 males) living in Dijon. All these patients met the ACR criteria. The corresponding annual incidence of GCA was 10.9/100 000/year (95% CI 4.4 to 17.3) in individuals aged  $\geq 50$  years old and 13.4/100 000/year (95% CI 6.3 to 20.6) in those aged  $\geq 55$  years old.

Nine of these patients were identified in the Dijon Stroke Registry as having suffered from a stroke between 1 January 1985 and 28 January 2012. For three of these patients, the



stroke occurred before the first symptoms of GCA (5, 15 and 113 months before), and for two, the stroke occurred >4 weeks after the start of treatment for GCA (24 and 38 months later). The characteristics of these patients for whom stroke was not considered to be GCA-related are shown in online supplementary table S1. Of note, for patient 2, who had a stroke only 5.1 months before GCA was diagnosed, no GCA-related symptoms were observed at stroke onset or during the acute stage. Apart from one patient for whom data were lacking, none of these patients had a stroke involving the vertebral territory, 4 were women and 4 had hypertension in their medical history (see online supplementary table S1).

The remaining four patients (7.0% of patients with GCA living in the city of Dijon) had thus suffered from GCA-related stroke according to our criteria (figure 1). The characteristics of these four patients are summarised in table 1. One patient had stroke 2 weeks after glucocorticoids had been started. In this patient, heparin was also given at the time glucocorticoids were started because of central retinal artery occlusion and AION. Heparin was administered for 10 days and then stopped and replaced with aspirin (100 mg/day) 3 days before occurrence of the stroke, which was related to small vessel occlusion (TOAST 3). Of note, at the time of the stroke in this patient, diabetes was well controlled even though the patient was being treated with steroids. For the other three patients, GCA was revealed by the stroke. In patient 3, GCA symptoms (weakness, anorexia, weight loss and acute phase syndrome) had started 1 month before the stroke, making clinicians to perform a TAB that subsequently revealed GCA.

All of the patients had at least two risk factors in addition to age for atherosclerosis. All suffered from arterial hypertension, which was already treated before stroke onset in all the cases. Of note, 3/4 cases (75%) were male. In the biopsy-proven GCA cohort of patients, 3/18 (16.7%) males had stroke versus 1/39 (2.6%) females ( $p=0.088$ ).

The topography of stroke was vertebrobasilar in 3/4 (75%) cases. In patient 2, no CT scan was performed but symptoms could be compatible with a massive or brainstem stroke. Of note, this patient was already receiving an effective dose of heparin for atrial fibrillation before GCA was confirmed and the stroke occurred (table 1).

Between 1 January 2001 and 28 January 2012, 2305 strokes that occurred in people  $\geq 50$  years old were registered in the Dijon Stroke Registry, including 1966 ischaemic, 285 haemorrhagic, and 54 undetermined strokes. Among these, four

(0.17%) were directly related to GCA. The crude incidence rate of stroke associated with GCA in patients aged  $\geq 50$  years old was 0.76/100 000/year (95% CI 0 to 2.47). Corresponding figures were 1.36/100 000/year in men (95% CI 0 to 3.63) and 0.33/100 000/year (95% CI 0 to 1.45) in women. The European standardised rate was 0.57/100 000/year (95% CI 0 to 2.05).

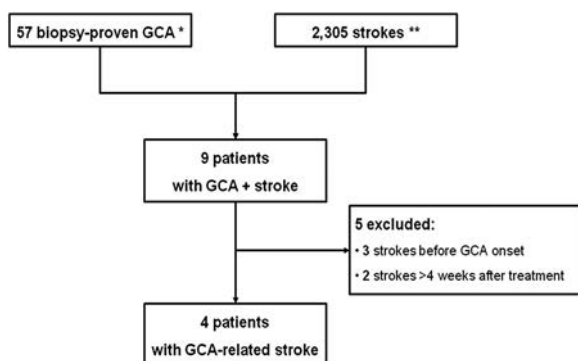
## DISCUSSION

To our knowledge, this report is the first population-based study that assessed the frequency of stroke among patients with GCA and provided the incidence rate of stroke associated with GCA.

Herein, we confirmed that stroke is a rare complication of GCA, occurring in 7.0% of biopsy-proven GCA. This is consistent with other studies, in which the authors reported cerebrovascular complications in 6.1–7.2% of patients with GCA.<sup>13 25</sup> A lower frequency of stroke was reported by Gonzalez-Gay *et al*,<sup>15</sup> who reported that 8 of their 287 (2.8%) biopsy-proven patients with GCA experienced a stroke between the onset of GCA symptoms and 4 weeks after the beginning of glucocorticoids. Because of the small absolute number of recorded events, direct comparisons between series are difficult. However, it could be hypothesised that we observed more cases of stroke in our study because of the prospective population-based setting, which allowed the assessment of all cases of hospitalised and non-hospitalised patients with stroke. This design is the main strength of our study and ensures the accuracy of data collection.

The risk factors for developing stroke during GCA have already been described.<sup>15</sup> Men are more at risk than women of developing stroke. We observed the same trend in our work, though the difference failed to reach the level of significance because the number of events was too small. Other risk factors for stroke during GCA are a history of visual loss, smoking, arterial hypertension and a high haemoglobin level.<sup>15</sup> It is worth mentioning that all of the patients who had a GCA-related stroke in our study had  $\geq 2$  major vascular risk factors.

For three of our patients, the clinical symptoms clearly suggested posterior stroke involving the vertebrobasilar territory. For the remaining patient, because the clinical presentation was severe and rapidly led to death, no brain CT scan was performed and it was not possible to determine the exact topography of the lesion, even though the clinical symptoms were compatible with a massive or a brainstem stroke, which could have been ischaemic or haemorrhagic as this patient was being treated with heparin for atrial fibrillation. Of note, apart for one patient for whom data were lacking, strokes that were not considered GCA-related did not involve the vertebrobasilar territory, but were related to multiple lacunes or carotid atherosclerosis, and essentially occurred in women. This finding is consistent with the fact that stroke predominantly affects women and that atherosclerosis and small vessel disease are the leading cause when all patients aged  $>50$  years old included in the Dijon Stroke Registry are considered.<sup>26</sup> Even though we cannot exclude the possibility that the four GCA-related strokes we recorded in this study could have resulted from thromboembolic or cardioembolic diseases, the epidemiological differences we recorded between GCA-related and GCA-unrelated strokes argue for a specific link between GCA and strokes and suggest that the vascular inflammation triggered by GCA could synergise with other cardiovascular risk factors to induce strokes in the vertebrobasilar territory. Consistent with this hypothesis, the high frequency of vertebrobasilar territory involvement in



**Figure 1** Flow chart of the study. \*In Dijon between 1 January 2001 and 31 December 2011. \*\*In people  $\geq 50$  years old living in Dijon between 1 January 2001 and 28 January 2012. GCA, giant cell arteritis.

**Table 1** Characteristics of the four patients who had a GCA-related stroke among the 57 biopsy-proven patients with GCA

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Age (years)	82.8	80.4	80.5	89.2
Sex	F	M	M	M
Vascular risk factors	Hypertension, diabetes, hypercholesterolaemia, coronary heart disease, PAD	Hypertension, hypercholesterolaemia, atrial fibrillation, smoking, cardiac failure	Hypertension, diabetes, coronary heart disease	Hypertension, hypercholesterolaemia, paroxysmal atrial fibrillation, coronary heart disease, cardiac failure
Stroke characteristics				
Type	Ischaemic	Undetermined	Ischaemic	Ischaemic
NIHSS score at onset	2	30	4	0
Clinical presentation	Headache, dizziness and ataxia	Hypotonia, major impaired consciousness, left gaze deviation	Vestibular and static cerebellar syndromes, dizziness, right Horner's sign	Partially reversible cortical blindness
Imaging				
CT-scan during acute stage	Multiple lacunes	Not available	Right cerebellar infarct, occlusion of right vertebral artery	Normal
Doppler sonography of cervical arteries	Normal	Not available	Atherosclerosis, occlusion of right vertebral artery	Atherosclerosis without stenosis
Echocardiography	Normal	Not available	Not available	Not available
ECG	Sinus rhythm	Atrial fibrillation	Sinus rhythm	Sinus rhythm
Holter ECG	Sinus rhythm	Not available	Sinus rhythm	Sinus rhythm
TOAST classification according to stroke neurologist	Small vessel occlusion (TOAST 3)	Not available	Large artery atherosclerosis (TOAST 1)	Other determined aetiology (TOAST 4)
GCA characteristics				
Time between stroke and GCA diagnosis	2 weeks later	Simultaneous	1 month before stroke	Simultaneous
Clinical presentation	Visual loss (left CRAO and right AION), headache	Headache, severe weakness	Severe weakness, anorexia, weight loss	Weight loss, headache, cough, jaw claudication, scalp tenderness
Aortitis	Not available	Not available	No	No
Biology				
ESR (mm/h)	68	62	50	40
CRP (mg/L)	28	45.6	47	245.9
Fibrinogen (g/L)	5.1	5.7	6.2	4.5
LDL cholesterol (mmol/L)	2.93	not available	4.03	2.05
HDL cholesterol (mmol/L)	1.76	not available	1.3	0.49
Triglycerides (mmol/L)	1.3	not available	1.11	1.33
Glycaemia (mmol/L)	5.5	5.26	5.1	4.8
Temporal artery biopsy	GCA	GCA	GCA	GCA
Treatment	Aspirin (100 mg/day), prednisone (1 mg/kg), heparin (hypocoagulation)	Aspirin (160 mg/day), prednisone (1 mg/kg), heparin (hypocoagulation)	Aspirin (75 mg/day), prednisone (0.7 mg/kg/day)	Aspirin (75 mg/day), methylprednisolone, prednisone (1 mg/kg), enoxaparin (isocoagulation)
Outcome	Recovery; alive 22 months later	Death 6 days later	Recovery (NIHSS=1); alive 20 months later	Partial recovery (visual sequelae); death (severe pneumonia) 1.4 months later

AION, acute ischaemia of the optic nerve; CRAO, central retinal artery occlusion; CRP, C-reactive protein; ECG, electrocardiogram; ESR, erythrocyte sedimentation rate; F, female; GCA, giant cell arteritis; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; M, male; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; PAD, peripheral artery disease; TOAST, Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment classification.

patients with GCA-related stroke has already been reported in the literature.<sup>14 15</sup> Interestingly enough, Pfadenhauer *et al* evaluated by colour duplex sonography the frequency of vertebrobasilar involvement in 93 prospectively followed patients with GCA. Vertebrobasilar ischaemia was detected in 4.3% of these patients, being associated with proximal vertebral artery occlusive disease in all of them and hypoechogenic mural thickening of the proximal segments V0/V1 of the vertebral artery in half of them.<sup>27</sup> This study underlines how helpful could be the use of colour duplex sonography for GCA diagnosis in case of stroke involving the vertebral arteries. Furthermore, it suggests the potential interest of US scan to identify patients at risk of stroke during GCA.

The major strength of our study was the population-based setting, which allowed the exhaustive and prospective assessment of all cases of stroke occurring in a geographically defined area. Our study design made it possible to determine the incidence of GCA-related stroke, which appeared to be low. GCA-related stroke was found to affect fewer than eight individuals aged  $\geq 50$  years old per million per year. However, several limitations must be acknowledged. Even though our results and those from others suggest that GCA-related strokes have a typical topographic distribution,<sup>14 15</sup> it is impossible to confirm this hypothesis because of the small absolute number of events we recorded in the present study. First, although all TABs performed in patients living in Côte d'Or were retrieved since only two pathology labs performed such analyses, it cannot be excluded that some patients refused the biopsy or that some TABs were too small or not performed in cases of isolated PMR. Second, the sensitivity of TAB ranges from  $\sim 70\%$  to  $>90\%$ , and GCA can be diagnosed on clinical grounds alone in the absence of histological evidence, even if biopsy confirmation of GCA is important to prevent unnecessary glucocorticoid therapy over long periods.<sup>1 17</sup> As a result, the true incidence of GCA-related stroke could have been underestimated in our study, but, like others,<sup>15 28</sup> we chose to focus on biopsy-proven patients with GCA in order to analyse patients for whom there was no doubt concerning the diagnosis. Of note, the annual incidence rate of GCA observed in our study was consistent with the findings from a French study that reported a prevalence of both biopsy-proven and not proven GCA of 9.4/100 000/year in individuals aged  $\geq 55$  years old,<sup>29</sup> suggesting that our case-collection procedure limited to biopsy-proven GCA certainly did not influence our results excessively. Even though a gradient between northern and southern countries concerning the incidence of GCA has been reported,<sup>30</sup> thus making it difficult comparisons, a Danish study evaluated the proportion of biopsy-proven and not proven GCA cases, and showed that the incidence rate for GCA in the population  $>50$  years was 20.4/100 000 overall, whereas it was 15.1/100 000 when only considering biopsy-proven GCA.<sup>31</sup>

This population-based study demonstrated that GCA-related stroke essentially affects the vertebrobasilar territory and mainly occurs in old men with associated vascular risk factors. Although rare, GCA symptoms must be searched for in elderly patients with stroke, and optimal vascular prevention must be conducted carefully in patients with GCA with a high vascular risk.

**Acknowledgements** We thank Philip Bastable for editorial assistance.

**Contributors** All authors contributed to the article by drafting/revising the manuscript for content, collecting and analysing data, and approving the final manuscript. MS, MG, BB and YB additionally contributed to the conception and study design. MS and YB also contributed to statistical analysis.

**Funding** The Dijon Stroke Registry is supported by the French Institute for Public Health Surveillance (InVS) and INSERM. The study sponsors had no role in either the study design or the collection, analysis and interpretation data, the writing of the report or in the decision to submit the paper for publication.

**Competing interests** None.

**Ethics approval** The Dijon Stroke Registry was approved by the Comité National des Registres (French National Committee of Registers) and the InVS (French Institute for Public Health Surveillance). Authorisation of the CNIL (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés; National Commission for the Protection of the Privacy of Electronic Data) was obtained.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

## REFERENCES

- 1 Borchers AT, Gershwin ME. Giant cell arteritis: a review of classification, pathophysiology, geoeidemiology and treatment. *Autoimmun Rev* 2012;11: A544–54.
- 2 Salvarani C, Cantini F, Hunder GG. Polymyalgia rheumatica and giant-cell arteritis. *Lancet* 2008;372:234–45.
- 3 Salvarani C, Macchioni P, Zizzi F, *et al*. Epidemiologic and immunogenetic aspects of polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis in northern Italy. *Arthritis Rheum* 1991;34:351–6.
- 4 Jennette JC, Falk RJ, Andrasz K, *et al*. Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum* 1994;37:187–92.
- 5 Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, *et al*. 2012 revised international chapel hill consensus conference nomenclature of vasculitides. *Arthritis Rheum* 2013;65:1–11.
- 6 Ly KH, Regent A, Tamby MC, *et al*. Pathogenesis of giant cell arteritis: More than just an inflammatory condition? *Autoimmun Rev* 2010;9:635–45.
- 7 Samson M, Audia S, Fraszczak J, *et al*. Th1 and Th17 lymphocytes expressing CD161 are implicated in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica pathogenesis. *Arthritis Rheum* 2012;64:3788–98.
- 8 Samson M, Audia S, Martin L, *et al*. Pathogenesis of giant cell arteritis: new insight into the implication of CD161+ T cells. *Clin Experimental Rheumatol* 2013;31: S65–73.
- 9 Weyand CM, Ma-Krupa W, Goronzy JJ. Immunopathways in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Autoimmun Rev* 2004;3:46–53.
- 10 Weyand CM, Younge BR, Goronzy JJ. IFN-gamma and IL-17: the two faces of T-cell pathology in giant cell arteritis. *Curr Opin Rheumatol* 2011;23:43–9.
- 11 Aiello PD, Trautmann JC, McPhee TJ, *et al*. Visual prognosis in giant cell arteritis. *Ophthalmology* 1993;100:550–5.
- 12 Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrua C, Llorca J, *et al*. Visual manifestations of giant cell arteritis. Trends and clinical spectrum in 161 patients. *Medicine* 2000;79:283–92.
- 13 Caselli RJ, Hunder GG, Whisnant JP. Neurologic disease in biopsy-proven giant cell (temporal) arteritis. *Neurology* 1988;38:352–9.
- 14 Reich KA, Giansiracusa DF, Strongwater SL. Neurologic manifestations of giant cell arteritis. *Am J Med* 1990;89:67–72.
- 15 Gonzalez-Gay MA, Vazquez-Rodriguez TR, Gomez-Acebo I, *et al*. Strokes at time of disease diagnosis in a series of 287 patients with biopsy-proven giant cell arteritis. *Medicine* 2009;88:227–35.
- 16 Salvarani C, Cantini F, Boiardi L, *et al*. Polymyalgia rheumatica and giant-cell arteritis. *N Engl J Med* 2002;347:261–71.
- 17 Hunder GG, Bloch DA, Michel BA, *et al*. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1122–8.
- 18 WHO. *The world health report 2000: health systems improving performance*. Geneva: WHO, 2000.
- 19 Malmgren R, Warlow C, Bamford J, *et al*. Geographical and secular trends in stroke incidence. *Lancet* 1987;2:1196–200.
- 20 Sudlow CL, Warlow CP. Comparing stroke incidence worldwide: what makes studies comparable? *Stroke* 1996;27:550–8.
- 21 Béjot Y, Cordonnier C, Durier J, *et al*. Intracerebral haemorrhage profiles are changing: results from the Dijon population-based study. *Brain* 2013;136:658–64.
- 22 Béjot Y, Troisgros O, Gremeaux V, *et al*. Poststroke disposition and associated factors in a population-based study: the Dijon Stroke Registry. *Stroke* 2012;43:2071–7.
- 23 Béjot Y, Daubail B, Jacquin A, *et al*. Trends in the incidence of ischaemic stroke in young adults between 1985 and 2011: the Dijon Stroke Registry. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014;85:509–13.
- 24 Eurostat. 2006 European population. <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/eurostat/home> (accessed 6 Jan 2013).
- 25 Zenone T, Puget M. Characteristics of cerebrovascular accidents at time of diagnosis in a series of 98 patients with giant cell arteritis. *Rheumatol Int* 2013;33:3017–23.
- 26 Bejot Y, Caillier M, Ben Salem D, *et al*. Ischaemic stroke subtypes and associated risk factors: a French population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79:1344–8.

## Cerebrovascular disease

- 27 Pfadenhauer K, Esser M, Berger K. Vertebrobasilar ischemia and structural abnormalities of the vertebral arteries in active temporal arteritis and polymyalgia rheumatica—an ultrasonographic case-control study. *J Rheumatol* 2005;32:2356–60.
- 28 Wiszniewska M, Devuyst G, Bogousslavsky J. Giant cell arteritis as a cause of first-ever stroke. *Cerebrovasc Dis* 2007;24:226–30.
- 29 Barrier JH, Billaud E, Magadur G. [Respective prevalences and frequencies of Horton's disease and rhizomelic pseudopolyarthritis. Epidemiological study in the Loire-Atlantic department using a general practice research network (RESOMED 44)]. *Rev Med Interne* 1992;13:393–6.
- 30 Miller NR. Epidemiology of giant cell arteritis in an Arab population: a 22-year study. *Br J Ophthalmol* 2007;91:705–6.
- 31 Elling P, Olsson AT, Elling H. Synchronous variations of the incidence of temporal arteritis and polymyalgia rheumatica in different regions of Denmark; association with epidemics of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *J Rheumatol* 1996;23:112–19.



Disponible en ligne sur  
 ScienceDirect  
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
 EM|consulte  
 www.em-consulte.com



Mise au point

# Les lymphocytes T<sub>H</sub>17 : différenciation, phénotype, fonctions, et implications en pathologie et thérapeutique humaine

## *T<sub>H</sub>17 lymphocytes: Induction, phenotype, functions, and implications in human disease and therapeutic*

M. Samson<sup>a,c</sup>, D. Lakomy<sup>b,c</sup>, S. Audia<sup>a,c</sup>, B. Bonnotte<sup>a,\*,c</sup>

<sup>a</sup> Service de médecine interne et immunologie clinique, hôpital du Bocage, CHU de Dijon, 2, boulevard Maréchal-de-Lattre-de-Tassigny, 21079 Dijon cedex, France

<sup>b</sup> Laboratoire d'immunologie, plateau technique de biologie, hôpital du Bocage, CHU de Dijon, 2, boulevard Maréchal-de-Lattre-de-Tassigny, 21079 Dijon cedex, France

<sup>c</sup> Centre de recherche Inserm 866, faculté de médecine, 7, boulevard Jeanne-d'Arc, 21034 Dijon cedex, France

### INFO ARTICLE

Historique de l'article :  
 Disponible sur Internet le 12 juin 2010

Mots clés :  
 Réponse immunitaire  
 Lymphocytes T<sub>H</sub>17  
 Auto-immunité

Keywords:  
 Immune response  
 T<sub>H</sub>17 Lymphocytes  
 Auto-immunity

### R É S U M É

La différenciation des lymphocytes T helper (LT<sub>H</sub>) est une étape primordiale de la réponse immunitaire. Schématiquement, les LT<sub>H</sub>1 vont stimuler la réponse immunitaire cellulaire en activant les différentes cellules cytotoxiques ; les LT<sub>H</sub>2 vont orienter la réponse vers une réponse humorale par coopération avec les lymphocytes B (LB) qui sécrètent les anticorps et les lymphocytes T régulateurs (LTreg) sont des cellules immunosuppressives qui inhibent la réponse immunitaire. Récemment, a été découverte une nouvelle population lymphocytaire : les lymphocytes T helper 17 (LT<sub>H</sub>17), caractérisés par leur capacité à sécréter de l'interleukine 17 (IL-17). Cette revue fait le point sur les connaissances actuelles de cette population lymphocytaire, notamment sur leur genèse, leur phénotype, leurs fonctions, leur rôle dans la réponse immunitaire anti-infectieuse ainsi que dans la pathogénie des maladies auto-immunes et auto-inflammatoires et les nouvelles cibles thérapeutiques potentielles qui découlent de ces connaissances.

© 2010 Société nationale française de médecine interne (SNFMI). Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

### A B S T R A C T

Differentiation of naive CD4<sup>+</sup> T helper (T<sub>H</sub>) cells is a major step of the adaptative immune response. When activated by pathogens in a specific cytokine environment, CD4<sup>+</sup> T cells differentiate into different subsets of T<sub>H</sub> cells with specific effector functions. T<sub>H</sub>1 lymphocytes orchestrate cellular immune response by producing interferon-γ and stimulating cytotoxic cells whereas T<sub>H</sub>2 cells orchestrate humoral immune response by producing interleukin-4 (IL-4), IL-5 and IL-10, leading to immunoglobulin production. Conversely, regulatory T cells (Treg) are capable of inhibiting immune response. Recently discovered, T<sub>H</sub>17 cells are characterized by their ability to produce IL-17 and play an important role in anti-infectious and inflammatory immune responses. This review focuses on present knowledge about T<sub>H</sub>17 cells: their induction, phenotype, functions, implications in host defense and human disease, and their potential to represent possible therapeutic targets.

© 2010 Société nationale française de médecine interne (SNFMI). Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

### 1. Abréviations

Ag antigène  
 CCLx chemokine (C-C motif) ligand  
 CD cluster of differentiation

CINC cytokine-induced neutrophil chemokines  
 CPA cellule présentatrice d'antigène  
 CXCLx chemokine (Cx motif) ligand  
 DC cellule dendritique  
 Foxp3 forkhead/winged-helix box protein 3  
 G-CSF granulocyte-colony stimulating factor  
 GM-CSF granulocyte-macrophage colony-stimulating factor  
 AHR aryl hydrocarbon receptor  
 ICOS inducible co-stimulator

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [bernard.bonnotte@chu-dijon.fr](mailto:bernard.bonnotte@chu-dijon.fr) (B. Bonnotte).

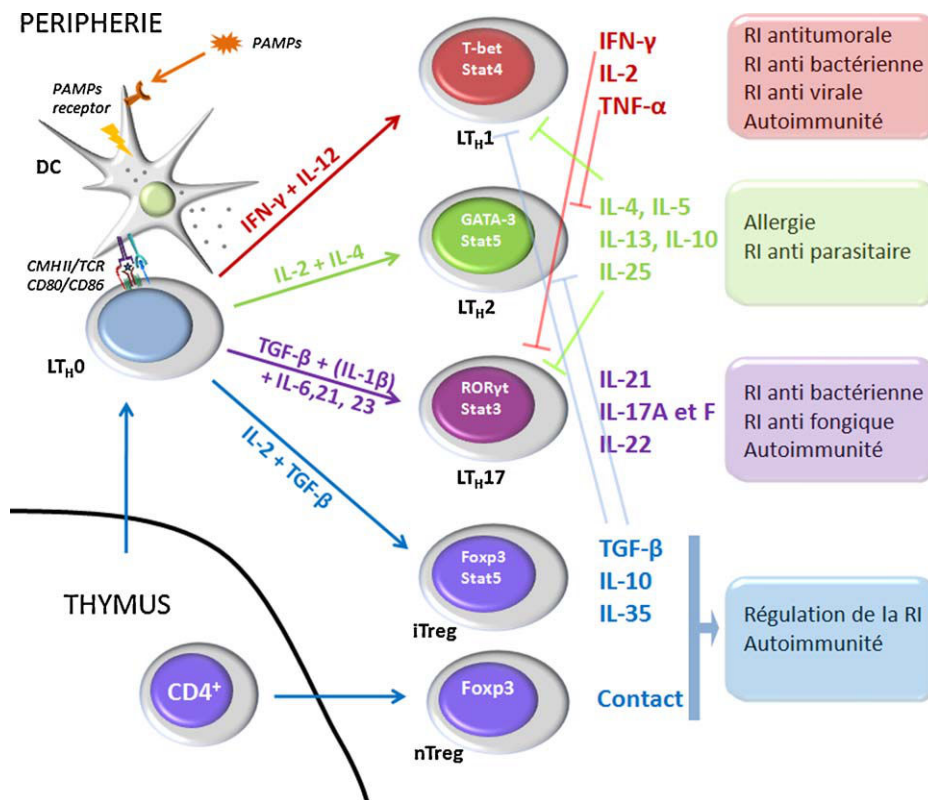


IL-x	interleukine-x
IL-1Ra	antagoniste du récepteur de l'IL-1
INF- $\gamma$	interféron-gamma
LB	lymphocyte B
LT	lymphocyte T
LT <sub>H</sub> x	lymphocyte T helper x
LTreg	lymphocyte T régulateur
MC	maladie de Crohn
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
NK	natural killer
NLR	(NOD)-like receptor
NOD2	nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
PAMP	pathogen associated molecular patterns
PNN	polynucléaires neutrophiles
PNE	polynucléaires éosinophiles
PR	polyarthrite rhumatoïde
PRR	pattern recognition receptor
RANK/RANKL	receptor activator of NF $\kappa$ B / receptor activator of NF $\kappa$ B ligand
RAR	retinoic acid receptor
ROR- $\gamma$ t	retinoic acid-related orphan receptor-gamma t
SEP	sclérose en plaques
STAT	signal transducer and activator of transcription
TCR	récepteur des cellules T
TGF- $\beta$	transforming growth factor-bêta

TLR	toll-like receptor
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor-alpha

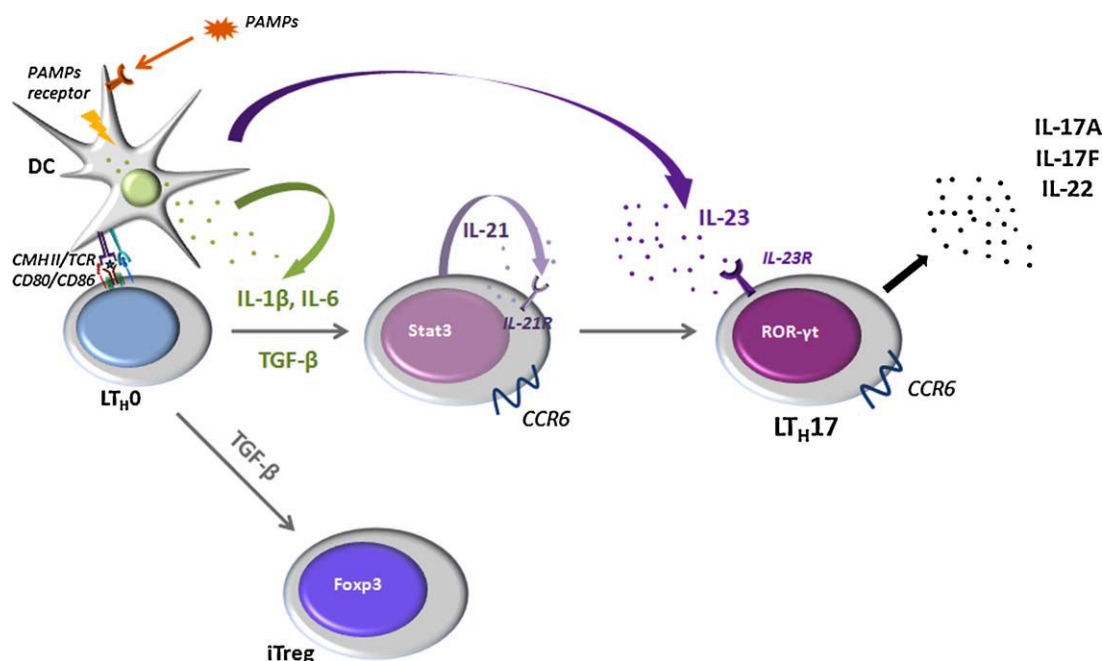
## 2. La réponse immunitaire et la différenciation des lymphocytes T auxiliaires

Une des caractéristiques du système immunitaire des vertébrés est l'existence de lymphocytes qui participent à la réponse immunitaire adaptative (Fig. 1). Cette réponse immunitaire élaborée, spécifique d'Ag, est importante dans tous les domaines de l'immunité : infection, hypersensibilité, auto-immunité, cancer et rejet de greffe. Ainsi, en cas d'infection, les agents pathogènes peuvent être directement détruits par les cellules de la réponse immunitaire innée (polynucléaires, cellules NK, macrophages) et/ou captés par des CPA qui vont présenter les Ag infectieux aux LT. Les LT qui vont reconnaître l'Ag et vont s'activer s'ils reçoivent un second signal via des interactions moléculaires avec les CPA, en particulier grâce aux molécules de costimulation. Les LT CD4<sup>+</sup> naïfs activés vont ensuite se différencier en divers types de LT ayant des fonctions effectrices distinctes, permettant de recruter différents types cellulaires pour in fine, éliminer l'agent pathogène responsable de l'agression initiale. Il y a plus de 20 ans, Mossman et al. [1] ont décrit deux populations de LT CD4<sup>+</sup> : les LT<sub>H</sub>1 et LT<sub>H</sub>2. C'est l'environnement cytokinique qui va orienter la différenciation du LT naïf (LT<sub>H</sub>0) vers la voie T<sub>H</sub>1 ou T<sub>H</sub>2. Dans un environnement riche



**Fig. 1.** La différenciation des lymphocytes T auxiliaires (LT<sub>H</sub>). Lorsqu'un lymphocyte T naïf (LT<sub>H</sub>0) est activé par la reconnaissance d'un antigène présenté par une CPA, il peut se différencier en plusieurs populations lymphocytaires : LT<sub>H</sub>1, LT<sub>H</sub>2, LT<sub>H</sub>17 ou LT régulateur induit (iTreg). Ces différentes populations de LT coordonnent divers types de réponses immunitaires notamment via les cytokines qu'ils vont sécréter. Schématiquement, les LT<sub>H</sub>1 vont stimuler la réponse immunitaire cellulaire en activant les cellules cytotoxiques essentielles dans la réponse immunitaire antibactérienne et antitumorale, les LT<sub>H</sub>2 vont orienter la réponse vers une réponse humorale par coopération avec les LB qui sécrètent les anticorps, les iTreg ou les LT régulateurs naturels d'origine thymique (nTreg) sont des cellules immunosuppressives qui régulent négativement la réponse immunitaire. L'orientation de cette différenciation est fonction de l'environnement cytokinique. La CPA, notamment la cellule dendritique (DC), activée par des PAMP reconnus comme des « signaux danger » par des récepteurs spécifiques, les PRR dont la famille des toll-like receptor (TLR) est la plus connue, oriente la différenciation du LT et donc de la réponse immunitaire grâce au type de cytokines sécrétées : T<sub>H</sub>1 par l'IFN $\gamma$  et l'IL-12, T<sub>H</sub>2 par l'IL-4, T<sub>H</sub>17 par le TGF- $\beta$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-23 et l'IL-6 ou Treg par le TGF- $\beta$ .

CPA : cellule présentatrice d'antigène ; Foxp3 : forkhead/winged-helix box protein 3 ; IL : interleukine ; IFN- $\gamma$  : interféron-gamma ; LT<sub>H</sub> : lymphocyte T helper ; PAMP : pathogen associated molecular patterns ; PRR : pattern recognition receptor ; RI : réponse immunitaire ; ROR- $\gamma$ t : retinoic acid-related orphan receptor-gamma-t ; STAT : signal transducer and activator of transcription ; TGF- $\beta$  : transforming growth factor-beta ; TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor-alpha.



**Fig. 2.** La différenciation des  $LT_H17$  et la dichotomie  $LT_H17$ /Treg. Après activation par une cellule dendritique (DC), les lymphocytes T naïfs ( $LT_H0$ ) se différencient en  $LT_H17$  sous l'action conjointe de l'IL-1 ou de l'IL-6 associé au TGF- $\beta$  sécrétés par la DC. Une boucle d'amplification est ensuite réalisée grâce à la sécrétion autocrine d'IL-21. Enfin, l'IL-23 permet la stabilisation et l'expansion de la lignée cellulaire  $T_H17$  en agissant sur le récepteur membranaire de l'IL-23 (IL-23R) exprimé par les  $LT_H17$  et induit la sécrétion d'IL-17A, IL-17F et IL-22. Le facteur de transcription principal des  $LT_H17$  est ROR- $\gamma$ t (produit du gène RORc) : il va provoquer via STAT-3 la synthèse d'IL-17A et F. STAT-3 est un facteur de transcription essentiel de la différenciation des  $LT_H17$  puisque la sécrétion d'IL-21 induite par l'IL-6 et le TGF- $\beta$  est entièrement dépendante de STAT-3. Les  $LT_H17$  expriment à leur surface CCR6, récepteur de la chimiokine CCL20, qui est capitale pour le recrutement des  $LT_H17$  sur le site de l'inflammation. En présence de TGF- $\beta$  sans IL-6 dans l'environnement cellulaire, les  $LT_H0$  se différencient en Treg. Cette dichotomie entre Treg et  $LT_H17$  a été bien démontrée chez la souris. CCR6 : C-C chemokine receptor 6 ; IL : interleukine ; Foxp3 : forkhead/winged-helix box protein 3 ;  $LT_H$  : lymphocyte T helper ; ROR- $\gamma$ t : retinoic acid-related orphan receptor- $\gamma$  ; STAT : signal transducer and activator of transcription ; TGF- $\beta$  : transforming growth factor- $\beta$ .

en IL-12, les  $LT_H0$  vont se différencier en  $LT_H1$  qui, sous la dépendance des facteurs de transcription T-bet et STAT-4, sécrètent de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-2. Les  $LT_H1$  sont principalement impliqués dans la réaction immunitaire à médiation cellulaire : ils conduisent à l'activation des LT cytotoxiques et des macrophages qui participent à la réaction immunitaire antitumorale, antivirale et contre les bactéries intracellulaires. Dans un milieu riche en IL-4, les  $LT_H0$  se différencient en  $LT_H2$ , qui sécrètent principalement de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-10 sous l'influence du facteur de transcription GATA-3. Les  $LT_H2$  sont impliqués dans la réaction immunitaire humorale qui participe notamment à la sécrétion d'anticorps spécifiques, à l'atopie et à la réponse immunitaire antiparasitaire, via l'activation des polynucléaires éosinophiles par l'IL-5.

Cette dualité  $T_H1/T_H2$  fut bouleversée en 2005 avec la description d'une nouvelle population lymphocytaire T  $CD4^+$  : les  $LT_H17$ , caractérisés par leur capacité à produire une cytokine fortement pro-inflammatoire, l'IL-17 [2,3]. Les travaux réalisés sur les  $LT_H17$  ont montré leur implication dans la réponse immunitaire anti-infectieuse (notamment vis-à-vis des bactéries extracellulaires et des champignons) et aussi dans plusieurs pathologies dysimmunitaires telles que la PR, le psoriasis, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et l'asthme [4].

Cette mise au point a pour but de résumer les connaissances actuelles sur les  $LT_H17$  : leur différenciation, leurs fonctions, leur rôle dans la physiopathologie de la réponse immunitaire anti-infectieuse et dans les pathologies dysimmunitaires, ainsi que les nouvelles possibilités thérapeutiques qui découlent de la connaissance des  $LT_H17$ .

### 3. Les $LT_H17$ : différenciation et fonctions

Depuis leur découverte, de nombreux travaux réalisés sur les  $LT_H17$  chez l'homme et la souris ont permis de mieux connaître

leurs caractéristiques et notamment les étapes de leur différenciation et leurs fonctions effectrices. Malgré de nombreux points communs entre les  $LT_H17$  murins et humains, il existerait pour certains auteurs quelques différences que nous allons préciser.

#### 3.1. Différenciation des $LT_H17$ chez la souris

Plusieurs cytokines vont jouer successivement un rôle dans la différenciation et l'expansion des  $LT_H17$  chez la souris (Fig. 2). Tout d'abord, un environnement cytokinique riche en IL-6 et TGF- $\beta$  va induire la différenciation des  $LT_H0$  en  $LT_H17$ , phénomène amplifié en présence de cytokines inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-18 et le TNF- $\alpha$  [5,6]. La présence d'IL-6 et de TGF- $\beta$  est indispensable à la différenciation  $T_H17$  comme cela a été montré in vitro et in vivo en utilisant des modèles animaux dont les gènes pour ces deux cytokines avaient été invalidés. L'IL-6 et le TGF- $\beta$  vont induire une sécrétion autocrine d'IL-21 qui va entraîner l'expression de CCR6, récepteur de la chimiokine CCL20, du récepteur de l'IL-23 (IL-23R) et du facteur de transcription ROR- $\gamma$ t dans les LT en différenciation vers les  $LT_H17$ . Ensuite, l'IL-23 sécrétée par les macrophages et les cellules dendritiques stimulés par les cytokines inflammatoires (IL-1 $\beta$  et IL-6) permet la stabilisation et l'expansion de la lignée cellulaire  $T_H17$  en se fixant à l'IL-23R exprimé par les  $LT_H17$ . La liaison IL-23/IL-23R va induire la sécrétion des cytokines caractéristiques des  $LT_H17$  : IL-17A, IL-17F et IL-22 [7,8].

Le principal facteur de transcription des  $LT_H17$  est le ROR- $\gamma$ t, produit du gène RORc. Il va stimuler via STAT3, un autre facteur de transcription, la synthèse d'IL-17A et F. D'autres facteurs de transcription comme ROR- $\alpha$ , *interferon regulatory factor 4* (IRF4) et *aryl hydrocarbon receptor* (AHR) jouent un rôle synergique avec ROR- $\gamma$ t dans la différenciation  $T_H17$  mais ce dernier reste néanmoins le facteur de transcription le plus spécifique des  $LT_H17$  [9,10].

Il existe chez la souris une dichotomie entre les LTreg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> cellules immunosuppressives et les LT<sub>H</sub>17 pro-inflammatoires : la présence de TGF- $\beta$  seul dans l'environnement cellulaire génère des LTreg, tandis qu'associée à de l'IL-6, apparaissent des LT<sub>H</sub>17. De plus, le facteur de transcription Foxp3, spécifique des LTreg est capable d'inhiber le facteur de transcription des LT<sub>H</sub>17, ROR- $\gamma$ t [11]. Cette dichotomie LTreg et LT<sub>H</sub>17 pourrait être très importante dans la genèse des maladies auto-immunes.

### 3.2. Différenciation et phénotype des LT<sub>H</sub>17 chez l'homme

La genèse des LT<sub>H</sub>17 humains et murins diffère en certains points. Il a été montré que les LT<sub>H</sub>0 humains ne se différencient pas en LT<sub>H</sub>17 en présence d'IL-6 et de TGF- $\beta$  [12], la présence d'IL-6 et de TGF- $\beta$  étant capable d'induire l'expression de ROR- $\gamma$ t mais pas la sécrétion d'IL-17 [13]. Chez l'homme, la différenciation de LT<sub>H</sub>0 en LT<sub>H</sub>17 est obtenue sous l'action conjointe de l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$  [12] ou de l'IL-1 $\beta$  et l'IL-23 [14]. Néanmoins ces résultats sont discutés par d'autres auteurs qui ont montré que les milieux utilisés apportaient tout de même du TGF- $\beta$  « caché », présent notamment dans les plaquettes, et que même à faible concentration, cette cytokine était indispensable pour la différenciation T<sub>H</sub>17. En faveur de cette hypothèse, de récents travaux ont démontré que la présence de TGF- $\beta$  dans le milieu de culture en association avec de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 ou de l'IL-21 permettait d'induire la différenciation des LT<sub>H</sub>0 en LT<sub>H</sub>17 [8,15].

Les LT<sub>H</sub>17 humains proviennent d'un précurseur CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> présent dans le thymus, le sang périphérique et de cordon ombilical. Ces LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>, qui expriment de manière constitutive ROR- $\gamma$ t et IL-23R, peuvent se différencier en LT<sub>H</sub>1, LT<sub>H</sub>2 ou en LT<sub>H</sub>17 selon l'environnement cytokinique. La présence combinée d'IL-23 et d'IL-1 $\beta$  dans leur environnement favorise leur différenciation en LT<sub>H</sub>1 ou LT<sub>H</sub>17. L'ajout de TGF- $\beta$  inhibe l'expression de T-bet mais pas de ROR- $\gamma$ t : ainsi, seuls des LT<sub>H</sub>17 sont générés [16,17]. Le TGF- $\beta$  ne provoque donc pas directement la différenciation en LT<sub>H</sub>17 mais y joue un rôle indirect en inhibant la différenciation en LT<sub>H</sub>1. À l'inverse, les LT<sub>H</sub>0 n'exprimant pas le CD161 sont incapables de se différencier en LT<sub>H</sub>17, même en présence d'IL-23 et d'IL-1 $\beta$ .

Par ailleurs, il existe chez l'homme une population double positive (IFN- $\gamma$  et IL-17) dénommée lymphocytes T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>17 exprimant fortement ROR- $\gamma$ t et T-bet, alors qu'il n'existe aucune population double positive IL-4 et IL-17. En présence d'IL-12, ces deux populations produisent de l'IFN- $\gamma$  en plus de l'IL-17 avec une augmentation de l'expression de T-bet et une diminution de l'expression de ROR- $\gamma$ t. Il semble donc exister chez l'homme une certaine plasticité entre les populations T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>17 et T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>17 plutôt qu'entre LTreg et LT<sub>H</sub>17 comme observé chez la souris [18].

Les principales caractéristiques phénotypiques des LT<sub>H</sub>17 humains sont résumées dans le **Tableau 1** : forte expression de CCR6, CCR4, CCR2, IL-23R et ROR- $\gamma$ t et absence d'expression de CCR5. À l'inverse, les LT<sub>H</sub>1 expriment faiblement CCR6 et fortement CXCR3 [18–22].

**Tableau 1**

Principales caractéristiques phénotypiques des LT<sub>H</sub>1, LT<sub>H</sub>2, LT<sub>H</sub>17 et LT<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>17 humains.

	CD4	IL-4	IL-17	IFN- $\gamma$	ROR- $\gamma$ t	T-bet	CCR6	CXCR3	IL23-R	CD161
LT <sub>H</sub> 17	+	–	+	–	+	+/-	Fort	Faible	+	+
LT <sub>H</sub> 1	+	–	–	+	–	+	Faible	Fort	–	–
LT <sub>H</sub> 2	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–
LT <sub>H</sub> 17/1	+	–	+	+	+	+	Fort	Fort	+	+

+ : expression du marqueur ; – : absence d'expression du marqueur.

CD4 : cluster of differentiation 4 ; CD161 : cluster of differentiation 161 ; CXCR3 : chemokine (Cxc motif) receptor 3 ; IL-4 : interleukine-4 ; IL-23R : récepteur de l'IL-23 ; IFN- $\gamma$  : interféron-gamma ; ROR- $\gamma$ t : retinoic acid-related orphan receptor-gamma t ; TGF- $\beta$  : transforming growth factor-bêta.

### 3.3. Fonctions effectrices des LT<sub>H</sub>17

Les LT<sub>H</sub>17 sont caractérisés par leur capacité à sécréter différentes cytokines, essentiellement pro-inflammatoires : l'IL-17A, l'IL-17F et l'IL-22 (**Fig. 3**). Ils participent à la réponse anti-infectieuse, notamment vis-à-vis des pathogènes non pris en charge par les LT<sub>H</sub>1 ou les LT<sub>H</sub>2 et jouent un rôle dans l'émergence ou l'entretien de pathologies dysimmunitaires.

#### 3.3.1. IL-17A et F

L'IL-17A (ou IL-17) est le chef de file des six cytokines de la famille des IL-17, qui se compose des IL-17A à F. Elle est sécrétée de façon prédominante par les LT<sub>H</sub>17 mais aussi par les lymphocytes  $\gamma\delta$ , les PNN, les PNE, les monocytes et les lymphocytes T CD8 [23,24]. L'IL-17F est la seconde cytokine de la famille des IL-17 produite par les LT<sub>H</sub>17. Elle présente 50 % d'homologie avec l'IL-17A [25]. Elle est également produite par les macrophages [23,24,26].

L'IL-17 est produite à la fois par des cellules de l'immunité innée et de l'immunité adaptative, pouvant servir de lien entre les deux types d'immunité. L'IL-17RA est le récepteur de l'IL-17A : il est fortement exprimé par les cellules hématopoïétiques et plus faiblement par les ostéoblastes, les ostéoclastes, les cellules endothéliales et épithéliales. L'IL-17F interagit avec son récepteur l'IL-17RC qui est à l'inverse exprimé faiblement par les cellules hématopoïétiques et fortement par les cellules non hématopoïétiques [23,26].

L'IL-17A et F ont des propriétés inflammatoires et agissent sur un grand nombre de cellules. L'IL-17A et F stimulent la granulopoïèse et augmentent le recrutement, l'activation et la migration des PNN et des macrophages. Elles induisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), de G-CSF, de GM-CSF, de chémokines (CXCL1, *granulocyte chemotactic peptide 2* [GCP2], CXCL8 ou IL-8, CXCL10, CINC, MCP-1), de prostaglandine E2, de métalloprotéases et ont un rôle synergique avec le TNF- $\alpha$  pour promouvoir l'inflammation [23,24]. En outre, l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$  induisent une production d'IL-23 par les monocytes ou les cellules dendritiques, permettant une surproduction d'IL-17 créant ainsi une boucle d'amplification de la réponse T<sub>H</sub>17 [27].

L'IL-17 contribue aussi à la formation des centres germinatifs au sein desquels les lymphocytes B (LB) vont subir des mutations somatiques pour améliorer la spécificité des anticorps qui seront ensuite produits [28]. La source de l'IL-17 est le LT<sub>H</sub>17 et non le LT folliculaire *helper*. Les LT folliculaires *helper* expriment les molécules CXCR5<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup> et ICOS<sup>+</sup> et sont spécialisés dans l'interaction avec les LB (via ICOS notamment) dans le centre germinatif pour achever la différenciation B [29].

#### 3.3.2. IL-22

L'IL-22, membre de la famille de l'IL-10, est sécrétée par les LT<sub>H</sub>17 en réponse à une stimulation par l'IL-23, mais aussi par les LT activés et les cellules NK [23] (**Fig. 3**). Le récepteur de l'IL-22 est un hétérodimère composé de l'IL-22R1 et l'IL-10R2. À l'inverse de l'IL-17R, l'IL-22R n'est pas exprimé par les cellules immunitaires mais est exprimé de façon ubiquitaire par des cellules épithéliales et endothéliales. L'IL-22 a un rôle protecteur anti-infectieux au sein des épithéliums. Ainsi, l'IL-22 provoque la sécrétion de





différenciation se fera vers la voie  $T_H1$  ou  $T_H17$ . Plusieurs PAMP (signaux danger d'origine microbienne) ont été identifiés comme inducteurs de la sécrétion d'IL-23 par la DC : les peptidoglycanes (des molécules exprimées par le *Candida albicans*) les lectines de type C et le zymosan, via TLR2, NOD2 et les récepteurs des lectines de type C comme dectin-1 [36,37].

À l'inverse, plusieurs cytokines jouent un rôle négatif dans le développement des  $LT_H17$ . Les cytokines induisant les voies  $T_H1$  et  $T_H2$ , comme l'IFN- $\gamma$  et l'IL-4, vont réguler négativement la différenciation  $T_H17$  [4,7]. L'IL-27 est aussi un puissant inhibiteur des  $LT_H17$ . L'IL-27 inhibe le développement de maladies auto-immunes induites par les  $LT_H17$  comme l'encéphalite auto-immune expérimentale [38,39]. L'IL-2 inhibe aussi le développement des  $LT_H17$  murins. En inhibant l'expression de ROR- $\gamma$ t et en stimulant l'expression de Foxp3 via STAT5, l'IL-2 induirait le développement de LTreg [10] mais ces données restent controversées chez l'homme [14]. De récents travaux montrent que l'acide rétinique produit par les cellules dendritiques des muqueuses pourrait inhiber le développement des  $LT_H17$  au profit des LTreg. Ainsi les cellules dendritiques CD103<sup>+</sup> des muqueuses et des organes lymphoïdes de l'intestin qui produisent de l'acide rétinique et du TGF- $\beta$  sont de puissants inducteurs de LTreg. Cela pourrait expliquer la relative faible infiltration des muqueuses intestinales par les  $LT_H17$ . Il existerait donc à ce niveau un équilibre subtil entre la tolérance vis-à-vis des germes commensaux (rôle des LTreg) et les défenses anti-infectieuses vis-à-vis des germes considérés comme pathogènes (rôle des  $LT_H17$ ) [40].

Enfin, les  $LT_H17$  humains semblent moins sensibles à l'action suppressive des LTreg que les autres populations lymphocytaires [18]. De plus, les  $LT_H17$  résistent à l'action suppressive du TGF- $\beta$  [16]. Les  $LT_H17$  auraient donc la capacité d'échapper à certains des mécanismes de tolérance périphérique, favorisant ainsi l'émergence et l'entretien de pathologies inflammatoires et auto-immunes.

#### 4. Les $LT_H17$ : rôle dans les défenses anti-infectieuses

Le type de pathogènes induisant une réponse  $T_H17$  n'est pas très clair. En effet, il a été démontré que des germes aussi variés que : *Propionibacterium acnes*, *Helicobacter pylori*, *Citrobacter rodentium*, *Aspergillus fumigatus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacteroides* spp., *Borrelia* spp., *Mycobacterium tuberculosis* et *Candida albicans* induisaient une réponse  $T_H17$  avec une forte production d'IL-17 [23,41]. L'importance de la réponse  $T_H17$  dans les infections virales et parasitaires reste controversée. Il semblerait que les  $LT_H17$  jouent un rôle dans les défenses contre les infections par des pathogènes qui nécessitent une forte réaction inflammatoire, en faisant le lien entre immunité adaptative et innée. Au cours de l'infection par *Mycobacterium tuberculosis*, il existe une réponse  $T_H17$  précoce nécessaire à l'afflux de  $LT_H1$  au niveau pulmonaire pour contrôler l'infection [41]. Les preuves les plus convaincantes du rôle de la réponse  $T_H17$  ont été obtenues en utilisant des modèles animaux dans lesquels un des gènes essentiels à cette réponse était invalidé, tels les gènes de p19, sous-unité de l'IL-23, de l'IL-17 ou du récepteur de l'IL-17A. Contrairement aux souris sauvages, ces souris dont la réponse  $T_H17$  est inhibée ne peuvent pas détruire les pathogènes qui les infectent et meurent après infection à *Candida*, *Klebsiella* ou *Toxoplasma gondii* [42–44]. Le rôle primordial de l'IL-17 dans la réponse anti-infectieuse est l'initiation et la stimulation de la granulopoïèse et le chimiotactisme des PNN. Le mécanisme par lequel les agents infectieux déclenchent préférentiellement une réponse  $T_H17$  est très certainement dû aux propriétés des pathogènes eux-mêmes qui stimulent les cellules de l'immunité innée pour produire des cytokines particulières comme l'IL-23. Cette réponse semble prédominante en cas d'infection fongique puisque les patients qui ont un déficit génétique pour la

réponse IL-23/IL-17 ne peuvent pas contrôler ce type d'infection [45]. Néanmoins certains auteurs ont montré que l'inflammation médiée par une sécrétion dérégulée d'IL-17 induisait l'activation de  $LT_H17$  pathogènes qui entretenaient une inflammation chronique sans permettre l'éradication des champignons [46].

#### 5. Les $LT_H17$ : implication dans les maladies auto-immunes

Ces dernières années, de nombreux travaux ont démontré l'implication des  $LT_H17$  dans plusieurs maladies inflammatoires ou auto-immunes. La plupart des travaux ont été réalisés dans la PR, la sclérose en plaque, les maladies inflammatoires digestives et le psoriasis [4,14,47–50].

##### 5.1. La polyarthrite rhumatoïde

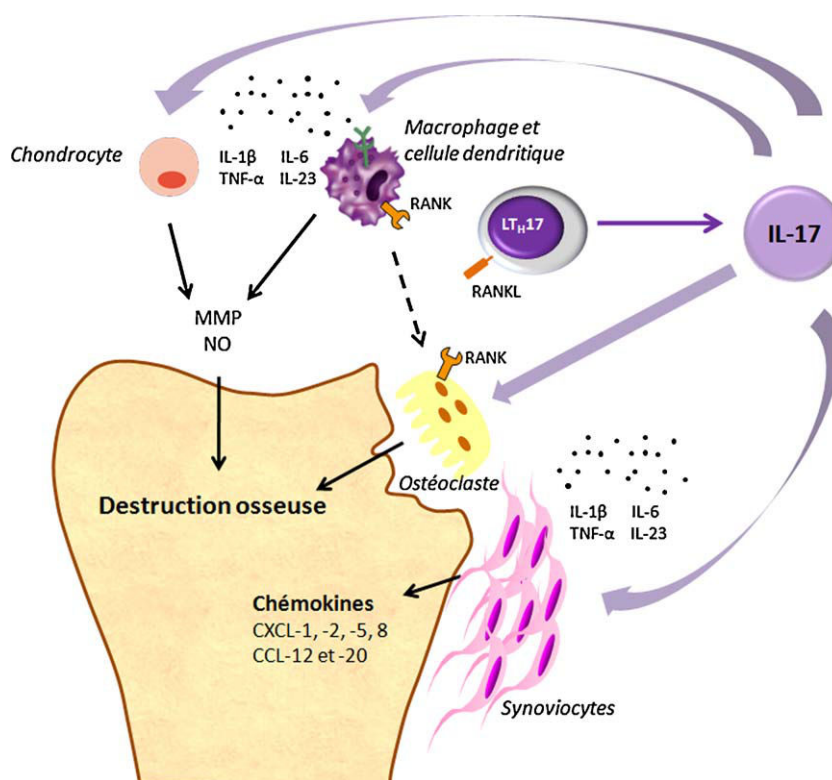
Dans les modèles expérimentaux de la PR, comme celui de l'arthrite au collagène, l'IFN- $\gamma$  était jusqu'à récemment considéré comme responsable de l'activation de la réponse immunitaire contre les articulations [51,52] même si certains travaux contradictoires attribuaient à l'IFN- $\gamma$  un effet protecteur [53,54] (Fig. 4). L'IFN- $\gamma$  est produit par les  $LT_H1$ , qui se différencient grâce à l'action de l'IL-12 et l'IL-18, sécrétées par les monocytes ou les cellules dendritiques activés. Les travaux réalisés montraient que les sécrétions d'IL-12, élément clé dans cette activation, étaient très augmentées. En réalité, il existait une confusion entre l'IL-12 et l'IL-23. Ces deux cytokines sont des hétérodimères composés de deux sous-unités : p35 et p40 pour l'IL-12, p19 et p40 pour l'IL-23 [55]. Or les dosages qui étaient supposés montrer une élévation de l'IL-12 étudiaient la partie commune de ces deux cytokines, la sous-unité p40. De récentes études ont confirmé le rôle princeps de l'IL-23 en montrant que les souris, dont les gènes p40 ou p19 étaient invalidés, étaient protégées de l'arthrite au collagène alors que les souris invalidées pour le gène p35, l'autre sous-unité de l'IL-12, développaient des arthrites plus sévères. Ainsi, l'arthrite au collagène n'est pas due à une réaction immunitaire de type  $T_H1$  via l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  mais de type  $T_H17$  via l'IL-23 [56]. À l'inverse, l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  ont plutôt un effet protecteur en inhibant la production d'IL-17 [4].

L'importance de l'IL-17 dans le développement des arthrites a été confirmée dans des modèles animaux : des souris dont le gène de l'IL-17 a été invalidé développent moins d'arthrites que les souris sauvages, et un traitement par anticorps neutralisant l'IL-17 ou par récepteurs solubles de l'IL-17 diminue l'intensité de l'atteinte articulaire [57–59].

L'équipe de Pierre Miossec a montré que l'IL-17 était significativement augmentée dans le sérum et le liquide synovial de malades atteints de PR comparativement à des patients souffrant d'arthrose [47]. Dans une étude prospective chez 60 patients atteints de PR, menée sur une période de deux ans, il a été rapporté qu'une forte expression des ARNm de l'IL-17, du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  était prédictive d'une progression plus rapide des lésions articulaires évaluées par imagerie par résonance magnétique (IRM) [60]. Il a été montré in vitro que l'IL-17 activait les monocytes, chondrocytes, macrophages, fibroblastes et ostéoblastes, entraînant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-23. L'IL-6 et l'IL-23 favorisent le développement des  $LT_H17$  et créent une boucle d'amplification qui conduit à l'activation perpétuelle des LT, phénomène probablement capital dans la genèse de la réaction auto-immune [61].

L'IL-17 entraîne aussi la sécrétion de chémokines par les cellules de la synoviale telles que CXCL1, -2, -5, -8 et CCL12 et -20 qui permettent le recrutement de LT, LB, monocytes et PNN au niveau de la membrane synoviale [61,62].

Les  $LT_H17$  jouent aussi un rôle direct dans la destruction articulaire. En effet, l'IL-17 favorise la sécrétion par les chondrocytes, les



**Fig. 4.** Rôle des  $LT_H17$  dans la physiopathologie de la PR. L'IL-17 produite par les  $LT_H17$  est augmentée dans le sérum et le liquide synovial de malades atteints de PR. Elle active les monocytes, chondrocytes, macrophages, fibroblastes et ostéoblastes, entraînant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-23. L'IL-6 et l'IL-23 favorisent le développement des  $LT_H17$  et créent une boucle d'amplification qui conduit à l'activation perpétuelle des LT, phénomène probablement capital dans la genèse de la réaction auto-immune. L'IL-17 entraîne aussi la sécrétion par les cellules de la synoviale de chémokines telles que CXCL1, 2, 5, 8 et CCL12 et 20 qui permettent le recrutement de LT, LB, monocytes et PNN au niveau de la membrane synoviale, favorisant l'emballement de la réponse inflammatoire au niveau de l'articulation. L'IL-17 favorise aussi la sécrétion par les chondrocytes, les cellules dendritiques et les macrophages de métalloprotéases et de monoxyde d'azote, responsables de la destruction cartilagineuse. De plus, l'IL-17 augmente l'expression de la molécule *receptor activator of NF $\kappa$ B* (RANK) à la surface des précurseurs des ostéoclastes. Les  $LT_H17$  exprimant à leur surface *receptor activator of NF $\kappa$ B* ligand (RANKL) sont donc capables d'activer directement les ostéoclastes responsables de la résorption osseuse. CCL12 : *chemokine (C-C motif) ligand* ; CXCL1 : *chemokine (CxC motif) ligand* ; LT : lymphocyte T ; LB : lymphocyte B ;  $LT_H17$  : lymphocyte T helper 17 ; PNN : polynucléaires neutrophiles ; PR : polyarthrite rhumatoïde ; RANK : *receptor activator of NF $\kappa$ B*.

cellules dendritiques et les macrophages de métalloprotéases et de monoxyde d'azote, responsables de la destruction cartilagineuse. De plus, l'IL-17 augmente l'expression de la molécule RANK à la surface des précurseurs des ostéoclastes. Or, les  $LT_H17$  expriment à leur surface RANKL et sont donc capables d'activer directement, via le système RANK/RANKL, les ostéoclastes responsables de la résorption osseuse [7,61,63].

## 5.2. Exemple de la maladie de Crohn

La MC a longtemps été considérée comme une maladie auto-inflammatoire à médiation essentiellement  $T_H1$ , avec production par les monocytes/macrophages de la *lamina propria* d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  [64]. Mais la découverte des  $LT_H17$  a bouleversé la connaissance de la physiopathologie de la MC ce qui offre de nouvelles possibilités thérapeutiques. Comme pour la PR, il a été montré que l'IL-23 et non l'IL-12 jouait un rôle essentiel dans la physiopathologie de la MC [65,66]. L'IL-23, sécrétée par les CPA en réponse à des stimulations provenant d'agents pathogènes ou non, joue un rôle critique dans l'activation de nombreuses cellules, tout particulièrement sur les  $LT_H17$  qui vont alors produire de l'IL-17. En faveur du rôle de l'IL-23 dans la pathogénie de cette maladie, une étude de cohorte a rapporté un polymorphisme du récepteur de l'IL-23 (Arg381Gln) associé à la MC et à la rectocolite ulcéro-hémorragique [67]. La voie  $T_H17$  semble donc, là encore, beaucoup plus impliquée dans la physiopathologie de la MC que la voie  $T_H1$ . La production d'IL-17A et F par les  $LT_H17$  dans le tube digestif de patients atteints de MC va exercer des effets

inflammatoires, principalement en stimulant la production de chémokines par les cellules épithéliales et endothéliales, comme la CCL20 sécrétée par les cellules épithéliales [68] ou le G-CSF par les cellules mésenchymateuses [69]. Les PNN et les autres cellules immunitaires ainsi recrutés vont amplifier l'inflammation locale. De plus, l'IL-17A et F entraînent la libération de métalloprotéases, d'IL-6 et d'IL-8 par les myofibroblastes de la paroi digestive responsables de l'inflammation locale et de la destruction de l'épithélium intestinal [70].

Cependant, certains auteurs ont montré l'implication d'une population  $LT_H1/T_H17$  et non pas  $LT_H17$  pure. En effet, l'IFN- $\gamma$  est comme l'IL-17 retrouvé à des taux élevés dans la muqueuse intestinale des patients atteints de MC. En outre, 40% des  $LT$   $CD4^+$  producteurs d'IL-17 extraits du sang et du tube digestif de patients atteints de MC sécrètent également de l'IFN- $\gamma$  (population  $LT_H1/T_H17$ ), ce qui permet d'expliquer la réaction granulomateuse que l'on observe dans la MC [18].

Cependant, ces hypothèses restent controversées car les travaux d'autres chercheurs réalisés dans des modèles expérimentaux de maladies intestinales inflammatoires suggèrent plutôt que l'inflammation et la destruction cellulaire seraient dues à l'IFN- $\gamma$  sécrété par les  $LT_H1$  et que l'IL-17 sécrétée par les  $LT_H17$  jouerait un rôle protecteur. En faveur de cette hypothèse, O'Connor et al. ont montré dans un modèle de maladies intestinales inflammatoires chez la souris, que l'IL-17 protégeait contre l'inflammation induite par les LT et que l'inactivation du gène de l'IL-17 induisait une spectaculaire aggravation de la maladie intestinale chez ces souris [71].

### 5.3. Autres maladies dysimmunitaires

Il est possible d'imaginer un rôle théorique des  $LT_H17$  dans la plupart des maladies inflammatoires chroniques. Suite à une agression endogène ou exogène ou à une anomalie génétique, les CPA (cellules dendritiques ou macrophages) seraient stimulées via leurs TLR ou NLR et sécrèteraient de forts taux d'IL-23 associés à d'autres cytokines inflammatoires dont l'IL-6. Si l'environnement local est aussi riche en TGF- $\beta$  produit par des LTreg ou d'autres cellules immunosuppressives, les  $LT_H0$  pourraient se différencier en  $LT_H17$ . La production exagérée d'IL-23 induirait ensuite l'activation des  $LT_H17$ . Ces derniers sécrèteraient alors de l'IL-17 et de l'IL-22 qui stimuleraient la sécrétion de chémokines de différentes natures par les cellules épithéliales et endothéliales locales. Le recrutement et l'activation de cellules cytotoxiques comme les polynucléaires et les macrophages sur le site induirait alors un état inflammatoire chronique. On peut également supposer que, si cette inflammation s'associe à la présentation d'auto-Ag provenant des cellules de l'organisme détruites, cette réponse  $T_H17$  puisse être à l'origine de maladies auto-immunes.

À ce jour, des travaux ont montré l'implication des  $LT_H17$  dans la pathogénie de plusieurs maladies dysimmunitaires : sclérose en plaque, psoriasis, asthme, sclérodermie, spondylarthrite ankylosante, arthrites réactionnelles, lupus érythémateux disséminé, maladie de Wegener, syndrome de Gougerot-Sjögren [4,14,47–50,72–76].

Malgré le récent engouement au sujet des  $LT_H17$ , ces cellules ne sont pas les seules impliquées dans la survenue de maladies auto-immunes. Les  $LT_H17$  agissent probablement de manière séquentielle et synergique avec d'autres cellules immunitaires clés telles que le  $LT_H1$ . Le rôle des  $LT_H17$  serait de faciliter l'emballage de la réponse immunitaire et le recrutement dans les tissus cibles de cellules inflammatoires et d'autres populations lymphocytaires comme les  $LT_H1$  [11,23]. Ce schéma peut-être trop simpliste est néanmoins l'objet de controverses actuelles, notamment concernant le rôle inflammatoire ou protecteur des  $LT_H17$ .

## 6. Les $LT_H17$ : de quelles cibles thérapeutiques dispose-t-on ?

La meilleure connaissance de la différenciation des  $LT_H17$  et de leur rôle en auto-immunité va permettre le développement de nouveaux traitements ciblant le  $LT_H17$ . Certains traitements bloquant la différenciation des  $LT_H17$  avaient déjà démontré leur efficacité dans des essais cliniques, avant même la découverte de ces lymphocytes.

### 6.1. Blocage de la genèse des $LT_H17$

Tous les inhibiteurs des cytokines indispensables à leur différenciation vont bloquer les effets des  $LT_H17$  et pourraient donc, en théorie, être indiqués dans le traitement des maladies dans lesquelles les  $LT_H17$  jouent un rôle majeur.

#### 6.1.1. Inhibition de l'IL-1

L'anakinra, analogue de l'IL-1Ra, qui inhibe les effets de l'IL-1 est indiqué dans la PR et a une certaine efficacité dans le traitement de la maladie de Still de l'adulte, du syndrome de Schnitzler, des arthrites juvéniles, de certaines dermatoses neutrophiliques et syndromes auto-inflammatoires héréditaires [77]. Deux autres inhibiteurs de l'IL-1, le riloncept et le canakinumab ayant une demi-vie supérieure à celle de l'anakinra sont en cours de développement. Les cytokines inflammatoires comme l'IL-1 amplifient la différenciation  $T_H17$ . Ces inhibiteurs de l'action de l'IL-1 devraient donc, en théorie, diminuer la différenciation des  $LT_H17$ .

#### 6.1.2. Inhibition de l'IL-6

Le tocilizumab est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le récepteur de l'IL-6 ce qui lui permet d'agir à la fois sur le récepteur membranaire et le récepteur soluble de l'IL-6. Il a montré son efficacité dans le traitement de la PR [78] seul ou en association avec le méthotrexate [79,80]. Il paraît également prometteur dans d'autres pathologies telles que la MC [81]. L'inhibition de l'IL-6 devrait en théorie bloquer la différenciation des  $LT_H17$  et favoriser celle des LTreg.

#### 6.1.3. Inhibition de l'IL-23

L'ustekinumab (CNTO-1275) est un anticorps monoclonal humain spécifique de la sous-unité p40, commune aux IL-12 et 23. Son efficacité et sa tolérance ont été rapportés dans deux essais de phase III au cours du psoriasis modéré à sévère [82,83]. L'ustekinumab est également prometteur pour le traitement de la MC [84]. L'IL-23 étant indispensable à l'activation et la stabilisation des  $LT_H17$  et à la sécrétion d'IL-17, les inhibiteurs de l'IL-23 devraient en théorie diminuer de façon drastique la voie  $T_H17$ .

#### 6.1.4. Inhibition de l'IL-21

L'IL-21 étant indispensable à l'expansion des  $LT_H17$ , le blocage de cette cytokine par des anticorps anti-IL-21 ou anti-IL-21R ou par des inhibiteurs de Jak3, une kinase essentielle de la voie de transduction de l'IL-21, pourrait être intéressant dans le traitement de certaines maladies auto-inflammatoires médiées par les  $LT_H17$  [85].

### 6.2. Blocage des fonctions effectrices des $LT_H17$

Les fonctions effectrices des  $LT_H17$  peuvent être inhibées par des inhibiteurs de l'IL-17 et de l'IL-22.

#### 6.2.1. Inhibition de l'IL-17

L'IL-17A et F sont des homodimères constitués de deux glycoprotéines reliées par un pont disulfure. Ces deux cytokines sont sécrétées par le  $LT_H17$  qui peut également synthétiser un hétérodimère : l'IL-17A/F. L'IL-17A est la plus puissante, l'hétérodimère A/F intermédiaire et l'IL-17F est la moins puissante en termes de capacité d'induction de sécrétion de cytokines inflammatoires par les cellules épithéliales et mésenchymateuses. De plus, il semble que l'IL-17A et F jouent des rôles distincts en pathologie. L'IL-17A semble prédominante dans le modèle d'arthrite au collagène et d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale. Quant à l'IL-17F, son rôle semble prépondérant dans la pathogénie de la MC. Il semble donc logique de chercher à inhiber l'IL-17A dans la PR et la SEP et l'IL-17F dans la MC [85]. Or, il existe deux récepteurs pour l'IL-17A et F : l'IL-17RC qui lie indifféremment l'IL-17A et l'IL-17F chez l'homme et l'IL-17RA dont l'affinité est beaucoup plus élevée pour l'IL-17A que l'IL-17F. Dans des modèles précliniques, différents inhibiteurs de l'IL-17 (anti-IL-17RA, anti-IL-17RC et récepteur soluble de type IL-17RC) ont montré leur efficacité dans le traitement de maladies inflammatoires, notamment la SEP et la PR. Différentes molécules sont en cours de développement chez l'homme : l'AIN457, un anticorps anti-IL-17 est en cours d'essai de phase II dans la PR, la MC, le psoriasis, la spondylarthrite ankylosante et les uvéites antérieures. Une protéine de fusion composée de deux molécules du récepteur soluble IL-17RC ainsi qu'un anticorps anti-IL-17RA seront bientôt testés [85].

#### 6.2.2. Inhibition de l'IL-22

L'inhibition de l'IL-22 via un anticorps anti-IL-22 ou un analogue de l'IL-22BP, inhibiteur naturel de l'IL-22, pourrait être intéressant



en thérapeutique mais de plus amples données sont nécessaires [85].

### 6.3. Nouvelles cibles thérapeutiques

Les facteurs de transcription qui contrôlent le développement des LT<sub>H</sub>17 sont également des cibles thérapeutiques prometteuses : ROR- $\gamma$ t, STAT3, le récepteur de l'acide rétinoïque, RAR et AHR [85]. L'acide rétinoïque, utilisé dans le traitement du psoriasis, a récemment montré qu'il pouvait bloquer la différenciation LT<sub>H</sub>17 et favoriser celle des LTreg [86].

Le blocage de CCR6 est également une voie d'avenir puisque cela bloquerait le recrutement des LT<sub>H</sub>17 sur le site inflammatoire. Le CCR6 est exprimé par les LT<sub>H</sub>17 mais pas par les LT<sub>H</sub>1 ou LT<sub>H</sub>2. C'est le récepteur de la chémokine CCL20 qui est produite par le LT<sub>H</sub>17 lui-même mais aussi par le synovioocyte ou le kératinocyte. CCL20 est retrouvée à des taux élevés dans le liquide articulaire de patients atteints de PR et dans la peau de patients atteints de psoriasis et pourrait donc être à l'origine de la migration des LT<sub>H</sub>17 dans les articulations atteintes de PR ou dans les lésions de psoriasis [20,87]. Dans un modèle murin d'arthrite, un anticorps anti-CCR6 freine significativement le développement des arthrites [20].

## 7. Conclusion

La découverte des LT<sub>H</sub>17 et de leurs caractéristiques biologiques a permis de faire progresser nos connaissances dans la physiopathologie de la réponse immunitaire anti-infectieuse et auto-immune. Le développement de thérapeutiques ciblant la différenciation ou les fonctions effectrices des LT<sub>H</sub>17 permettra de traiter plus efficacement les maladies inflammatoires ou auto-immunes avec une réponse T<sub>H</sub>17 dominante sous réserve que l'inhibition de la réponse anti-infectieuse ne soit pas trop délétère.

## Conflit d'intérêt

Aucun.

## Références

- [1] Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348–57.
- [2] Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123–32.
- [3] Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4<sup>+</sup> T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005;6:1133–41.
- [4] Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 2008;223:87–113.
- [5] Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006;24:179–89.
- [6] Gutmacher I, Urich E, Wolter K, Prinz M, Becher B. Interleukin 18-independent engagement of interleukin 18 receptor- $\alpha$  is required for autoimmune inflammation. *Nat Immunol* 2006;7:946–53.
- [7] Miossec P. Interleukin-17 in fashion, at last: ten years after its description, its cellular source has been identified. *Arthritis Rheum* 2007;56:2111–5.
- [8] Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-21 and TGF- $\beta$  are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 2008;454:350–2.
- [9] Chen Z, Laurence A, O'Shea JJ. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Semin Immunol* 2007;19:400–8.
- [10] Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 2007;26:371–81.
- [11] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235–8.
- [12] Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor- $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 2007;8:942–9.
- [13] Chen Z, Tato CM, Muul L, Laurence A, O'Shea JJ. Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. *Arthritis Rheum* 2007;56:2936–46.
- [14] Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007;8:950–7.
- [15] Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor- $\beta$  and induction of the nuclear receptor ROR $\gamma$ mat. *Nat Immunol* 2008;9:641–9.
- [16] Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, Querci V, De Palma R, et al. TGF- $\beta$  indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *Eur J Immunol* 2009;39:207–15.
- [17] Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunol* 2008;20:1361–8.
- [18] Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007;204:1849–61.
- [19] Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 2007;8:639–46.
- [20] Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, Maeda S, Teradaira S, Sugimoto N, et al. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med* 2007;204:2803–12.
- [21] Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, et al. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cell precursor. *J Exp Med* 2008;205:1903–16.
- [22] Sato W, Aranami T, Yamamura T. Cutting edge: Human Th17 cells are identified as bearing CCR2<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> phenotype. *J Immunol* 2007;178:7525–9.
- [23] Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008;453:1051–7.
- [24] Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004;21:467–76.
- [25] Fouser LA, Wright JF, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M. Th17 cytokines and their emerging roles in inflammation and autoimmunity. *Immunol Rev* 2008;226:87–102.
- [26] Starnes T, Robertson MJ, Sledge G, Kelich S, Nakshatri H, Broxmeyer HE, et al. Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. *J Immunol* 2001;167:4137–40.
- [27] Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KH, Lavelle EC. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2006;203:1685–91.
- [28] Hsu HC, Yang P, Wang J, Wu Q, Myers R, Chen J, et al. Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat Immunol* 2008;9:166–75.
- [29] Chtanova T, Tangye SG, Newton R, Frank N, Hodge MR, Rolph MS, et al. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J Immunol* 2004;173:68–78.
- [30] Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 2008;14:275–81.
- [31] Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 2007;13:1173–5.
- [32] Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Karow M, Flavell RA. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* 2007;27:647–59.
- [33] Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Shimomura Y, Andoh A, Bhan AK, et al. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2008;118:534–44.
- [34] Chang H, Hanawa H, Liu H, Yoshida T, Hayashi M, Watanabe R, et al. Hydrodynamic-based delivery of an interleukin-22-Ig fusion gene ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats. *J Immunol* 2006;177:3635–43.
- [35] Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* 2009;10:514–23.
- [36] LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, Osorio F, Slack EC, Tsoni SV, et al. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* 2007;8:630–8.
- [37] van Beelen AJ, Zelinkova Z, Taanman-Kueter EW, Muller FJ, Hommes DW, Zaai SA, et al. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* 2007;27:660–9.
- [38] Batten M, Li J, Yi S, Kljavin NM, Danilenko DM, Lucas S, et al. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol* 2006;7:929–36.
- [39] Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM, et al. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T

- helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* 2006;7:937–45.
- [40] Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF- $\beta$  and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 2007;204:1757–64.
  - [41] Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4<sup>+</sup> T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol* 2007;8:369–77.
  - [42] Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXCL chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 2001;194:519–27.
  - [43] Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* 2000;165:6107–15.
  - [44] Kelly MN, Kolls JK, Happel K, Schwartzman JD, Schwarzenberger P, Combe C, et al. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun* 2005;73:617–21.
  - [45] Ma CS, Chew GY, Simpson N, Priyadarshi A, Wong M, Grimbacher B, et al. Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3. *J Exp Med* 2008;205:1551–7.
  - [46] Zelante T, De Luca A, D'Angelo C, Moretti S, Romani L. IL-17/Th17 in anti-fungal immunity: what's new? *Eur J Immunol* 2009;39:645–8.
  - [47] Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, et al. Human interleukin-17: a T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1999;42:963–70.
  - [48] Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 2009;129:1339–50.
  - [49] Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003;52:65–70.
  - [50] Miossec P. IL-17 in rheumatoid arthritis: a new target for treatment or just another cytokine? *Joint Bone Spine* 2004;71:87–90.
  - [51] Cooper SM, Sriram S, Ranges GE. Suppression of murine collagen-induced arthritis with monoclonal anti-IL-1 antibodies and augmentation with IFN- $\gamma$ . *J Immunol* 1988;141:1958–62.
  - [52] Mauritz NJ, Holmdahl R, Jonsson R, Van der Meide PH, Scheynius A, Klareskog L. Treatment with gamma-interferon triggers the onset of collagen arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 1988;31:1297–304.
  - [53] Manoury-Schwartz B, Chiochia G, Bessis N, Abelsira-Amar O, Batteux F, Muller S, et al. High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN- $\gamma$  receptors. *J Immunol* 1997;158:5501–6.
  - [54] Vermeire K, Heremans H, Vandeputte M, Huang S, Billiau A, Matthys P. Accelerated collagen-induced arthritis in IFN- $\gamma$  receptor-deficient mice. *J Immunol* 1997;158:5507–13.
  - [55] Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 2006;116:1218–22.
  - [56] Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003;198:1951–7.
  - [57] Bush KA, Farmer KM, Walker JS, Kirkham BW. Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein. *Arthritis Rheum* 2002;46:802–5.
  - [58] Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Joosten LA, et al. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum* 2004;50:650–9.
  - [59] Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 2003;171:6173–7.
  - [60] Kirkham BW, Lassere MN, Edmonds JP, Juhasz KM, Bird PA, Lee CS, et al. Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). *Arthritis Rheum* 2006;54:1122–31.
  - [61] Lundy SK, Sarkar S, Tesmer LA, Fox DA. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis T lymphocytes. *Arthritis Res Ther* 2007;9:202.
  - [62] Kim KW, Cho ML, Kim HR, Ju JH, Park MK, Oh HJ, et al. Up-regulation of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) production in rheumatoid synovial fibroblasts through interactions with T lymphocytes: role of interleukin-17 and CD40L-CD40 interaction. *Arthritis Rheum* 2007;56:1076–86.
  - [63] Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 2006;203:2673–82.
  - [64] Reinecker HC, Steffen M, Witthoef T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, et al. Enhanced secretion of tumour necrosis factor- $\alpha$ , IL-6, and IL-1  $\beta$  by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1993;94:174–81.
  - [65] Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, McKenzie BS, et al. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 2006;203:2473–83.
  - [66] Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006;116:1310–6.
  - [67] Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006;314:1461–3.
  - [68] Caruso R, Fina D, Peluso I, Stolfi C, Fantini MC, Gioia V, et al. A functional role for interleukin-21 in promoting the synthesis of the T-cell chemoattractant, MIP-3 $\alpha$ , by gut epithelial cells. *Gastroenterology* 2007;132:166–75.
  - [69] Witowski J, Ksiazek K, Warnecke C, Kuzlan M, Korybalska K, Tayama H, et al. Role of mesothelial cell-derived granulocyte colony-stimulating factor in interleukin-17-induced neutrophil accumulation in the peritoneum. *Kidney Int* 2007;71:514–25.
  - [70] Yagi Y, Andoh A, Inatomi O, Tsujikawa T, Fujiyama Y. Inflammatory responses induced by interleukin-17 family members in human colonic subepithelial myofibroblasts. *J Gastroenterol* 2007;42:746–53.
  - [71] O'Connor Jr W, Kamanaka M, Booth CJ, Town T, Nakae S, Iwakura Y, et al. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat Immunol* 2009;10:603–9.
  - [72] Abdulahad WH, Stegeman CA, Limburg PC, Kallenberg CG. Skewed distribution of Th17 lymphocytes in patients with Wegener's granulomatosis in remission. *Arthritis Rheum* 2008;58:2196–205.
  - [73] Garrett-Sinha LA, John S, Gaffen SL. IL-17 and the Th17 lineage in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 2008;20:519–25.
  - [74] Jandus C, Bioley G, Rivals JP, Dudler J, Speiser D, Romero P. Increased numbers of circulating polyfunctional Th17 memory cells in patients with seronegative spondylarthritides. *Arthritis Rheum* 2008;58:2307–17.
  - [75] Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000;43:2455–63.
  - [76] Sakai A, Sugawara Y, Kuroishi T, Sasano T, Sugawara S. Identification of IL-18 and Th17 cells in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome, and amplification of IL-17-mediated secretion of inflammatory cytokines from salivary gland cells by IL-18. *J Immunol* 2008;181:2898–906.
  - [77] Chaffuer K, London J, Beaudouin C, Fautrel B. Indications of anakinra. *Presse Med* 2009;38:799–807.
  - [78] Nishimoto N, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Azuma J, et al. Study of active controlled tocilizumab monotherapy for rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate (SATORI): significant reduction in disease activity and serum vascular endothelial growth factor by IL-6 receptor inhibition therapy. *Mod Rheumatol* 2009;19:12–9.
  - [79] Genovese MC, McKay JD, Nasonov EL, Mysler EF, da Silva NA, Alecock E, et al. Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in rheumatoid arthritis with inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs: the tocilizumab in combination with traditional disease-modifying antirheumatic drug therapy study. *Arthritis Rheum* 2008;58:2968–80.
  - [80] Smolen JS, Beaulieu A, Rubbert-Roth A, Ramos-Remus C, Rovinsky J, Alecock E, et al. Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet* 2008;371:987–97.
  - [81] Ito H. Treatment of Crohn's disease with anti-IL-6 receptor antibody. *J Gastroenterol* 2005;40(Suppl. 16):32–4.
  - [82] Leonardi CL, Kimball AB, Papp KA, Yeilding N, Guzzo C, Wang Y, et al. Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 76-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 1). *Lancet* 2008;371:1665–74.
  - [83] Papp KA, Langley RG, Lebwohl M, Krueger GG, Szapary P, Yeilding N, et al. Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 52-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 2). *Lancet* 2008;371:1675–84.
  - [84] Sandborn WJ, Feagan BG, Fedorak RN, Scherl E, Fleisher MR, Katz S, et al. A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 2008;135:1130–41.
  - [85] Ouyang W, Filvaroff E, Hu Y, Grogan J. Novel therapeutic targets along the Th17 pathway. *Eur J Immunol* 2009;39:670–5.
  - [86] Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, et al. Reciprocal Th17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 2007;317:256–60.
  - [87] Schmuth M, Neyer S, Rainer C, Grassegger A, Fritsch P, Romani N, et al. Expression of the C-C chemokine MIP-3  $\alpha$ /CCL20 in human epidermis with impaired permeability barrier function. *Exp Dermatol* 2002;11:135–42.

## Pathogénie de l'artérite à cellules géantes

Maxime Samson<sup>1,2,3</sup>, Bernard Bonnotte<sup>1,2,3</sup>

1. CHU de Dijon, service de médecine interne et immunologie clinique, 21000 Dijon, France
2. Inserm, UMR 1098, 25020 Besançon cedex, France
3. Université de Bourgogne, faculté de médecine, IFR 100, 21000 Dijon, France

### Correspondance :

**Bernard Bonnotte**, CHU Dijon le Bocage, service de médecine interne et immunologie clinique, 2, boulevard Mal-de-Lattre-de-Tassigny, 21000 Dijon, France.  
[Bernard.bonnotte@chu-dijon.fr](mailto:Bernard.bonnotte@chu-dijon.fr)

Disponible sur internet le :  
14 août 2012

### ■ Key points

#### Giant-cell arteritis pathogenesis

*Giant-cell arteritis (GCA) involves large arteries, especially aorta and extra-cranial branches of external carotid.*

*Histo-pathological lesions affect all the layers of the artery leading to a segmental and focal panarteritis with a polymorphic cell infiltrate including T cells, macrophages and multinucleated giant cells, a fragmented internal elastic lamina and an intimal hyperplasia.*

*The pathophysiology of GCA is not fully understood. After dendritic cell activation in the adventitia, CD4 T cells are recruited in the arterial wall and polarized into Th1 and Th17 cells that produce IFN- $\gamma$  and IL-17. These cytokines activate macrophages, giant cells and smooth muscle cells inducing vascular remodeling leading to ischemic manifestations of GCA.*

*Macrophages infiltrating the adventitia produce IL-1 $\beta$  and IL-6 that are responsible for general symptoms encountered in GCA. In this review, we discuss GCA pathogenesis, with emphasis on the role of IL-6 as a promising therapeutic target.*

### ■ Points essentiels

L'artérite à cellules géantes (ACG) est une vascularite affectant les artères de gros calibre, notamment l'aorte et les branches extra-crâniennes de la carotide externe.

Les lésions histologiques affectent les 3 tuniques de l'artère réalisant une panartérite segmentaire et focale qui associe un infiltrat cellulaire polymorphe constitué de lymphocytes T, de macrophages et de cellules géantes multinucléées, une fragmentation de la limitante élastique et une hyperplasie intimale.

La physiopathologie de l'ACG n'est que partiellement connue. Après l'activation des cellules dendritiques de l'adventice, les lymphocytes T CD4 sont recrutés dans la paroi artérielle et se polarisent en lymphocytes Th1 et Th17 qui produisent de grandes quantités d'IFN- $\gamma$  et d'IL-17. Ces cytokines activent les macrophages, les cellules géantes et les cellules musculaires lisses aboutissant au remodelage vasculaire à l'origine des manifestations ischémiques de la maladie.

Les macrophages de l'adventice produisent des cytokines inflammatoires, l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6, responsables des signes généraux de l'ACG.

La meilleure connaissance de la physiopathologie de l'ACG permet d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques.

**L**a maladie de Horton (MH) ou artérite à cellule géantes (ACG) est classée, avec la maladie de Takayasu, dans le groupe des vascularites des artères de gros calibre [1]. Le terme d'artérite temporale ne doit plus être utilisé pour parler de l'ACG puisque l'atteinte des artères temporales n'est pas spécifique de la MH et peut se rencontrer dans d'autres vascularites comme la périartérite noueuse ou les vascularites associées aux anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires (ANCA). La MH est la vascularite la plus fréquente de l'adulte de plus de 50 ans. Le pic d'incidence se situe entre 70 et 80 ans. La prévalence de la MH varie selon les ethnies. Mêmes si les données sont parfois

contradictoires, la maladie est très rare chez les africains, les arabes, les hispaniques et les asiatiques [2–6]. Les prévalences les plus élevées sont rapportées parmi les populations d'origine scandinave comme dans le comté d'Olmsted dans le Minnesota où la prévalence a été estimée à 18,8 pour 100 000 habitants [7]. En France, la prévalence de la MH était de 9,4 cas pour 100 000 habitants de plus de 55 ans dans une étude menée en Loire Atlantique [8]. Ce gradient d'incidence Nord-Sud et la fréquence accrue de la maladie dans les pays scandinaves ont fait suspecter l'existence de prédispositions génétiques à développer une MH. Plusieurs travaux font état d'une augmentation significative de la prévalence des allèles HLA-DRB1\*0401, DRB1\*0404 ou DRB1\*0408, exprimés chez 60 % des patients ayant une pseudopolyarthrite rhizomélitique (PPR) ou une MH [9–11]. D'autres allèles HLA de classe I et II ont été associés à la MH [12]. Ces associations soulignent le rôle prépondérant de l'immunité adaptative cellulaire au cours du développement de la MH. Les allèles HLA sont en effet responsables d'une restriction des peptides présentés aux LT CD4<sup>+</sup> lors de l'interaction CMH-II, peptide et récepteur T (TCR). Comme au cours de la polyarthrite rhumatoïde, il existerait au cours de la MH un « épitope partagé ». En effet, une conservation de la séquence d'acides aminés entre les positions 28 et 31 du 2<sup>ème</sup> domaine de la chaîne  $\beta$  des molécules HLA de classe II associées à la MH (HLA-DRB1\*0401, HLA-DRB1\*0404 et HLA-DRB1\*0408) a été décrite [10]. D'autres gènes ont été étudiés et des polymorphismes des gènes du *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) [11], de l'interleukine-6 (IL-6) [13], de la *corticotropine-releasing hormone* (CRH) [14], de molécules d'adhésion cellulaire (ICAM-1), du promoteur du gène de RANTES, du récepteur de chémokine CCR5 ou du gène de l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1Ra) [11] ont été liés à un risque accru de développer une MH.

Certains travaux ont aussi décrit une variation cyclique et saisonnière de l'incidence de la maladie, faisant donc évoquer la participation d'un facteur environnemental et notamment infectieux dans le déclenchement de la maladie [15,16]. Il s'agit souvent d'étude cas/témoin qui ont détecté, par PCR ou Hybridation *in situ*, une augmentation de l'ADN de bactéries ou de virus dans les artères temporales de patients atteints de MH : Cytomégalo virus, Parvovirus B19, Herpès Simplex Virus et *Chlamydia pneumoniae* [17].

La MH est une panartérite inflammatoire à cellules géantes, non nécrosante, de topographie segmentaire et focale, touchant les artères de gros calibre, préférentiellement les branches de la carotide externe et en particulier l'artère temporale superficielle. Cependant, tous les gros troncs artériels (carotides, aorte, sous-clavières) peuvent être touchés [18]. La présentation histologique classique de la MH est une artérite à cellules géantes avec un infiltrat inflammatoire granulomateux, habituellement localisé à la jonction intima-média, constitué de lymphocytes T (LT) en majorité CD4<sup>+</sup>, de macrophages (MP) et

## Glossaire

<b>aCE</b>	Anticorps anti-cellules endothéliales
<b>ACG</b>	Artérite à cellules géantes
<b>aCL</b>	Anticorps anti-cardiolipines
<b>ANCA</b>	Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles
<b>BAT</b>	Biopsie d'artère temporale
<b>CCR</b>	Récepteur de chémokine (famille CC)
<b>CD</b>	Cluster de différenciation
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CML</b>	Cellule musculaire lisse
<b>CRH</b>	Corticotropine-releasing hormone
<b>CRP</b>	Protéine C réactive
<b>CXCR</b>	Récepteur de chémokine (famille CXC)
<b>DC</b>	Cellule dendritique
<b>HLA</b>	Human Leukocyte Antigen
<b>ICAM-1</b>	Intracellular Adhesion Molecule-1
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gamma
<b>IL-x</b>	Interleukine-x
<b>LEI</b>	Limitante élastique interne
<b>LT</b>	Lymphocyte T
<b>Lymphocyte Th</b>	Lymphocyte T helper ou auxiliaire
<b>MH</b>	Maladie de Horton
<b>MMP</b>	Métalloprotéase
<b>MP</b>	Macrophage
<b>PAMP</b>	Pathogen Associated Molecular Pattern
<b>PDGF</b>	Platelet-Derived Growth Factor
<b>PPR</b>	Pseudopolyarthrite rhizomélitique
<b>TCR</b>	T cell receptor
<b>TLR</b>	Toll like receptor
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor alpha
<b>VCAM-1</b>	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
<b>VDCA-2</b>	Voltage Dependent Anion-Selective Channel Protein 2
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor



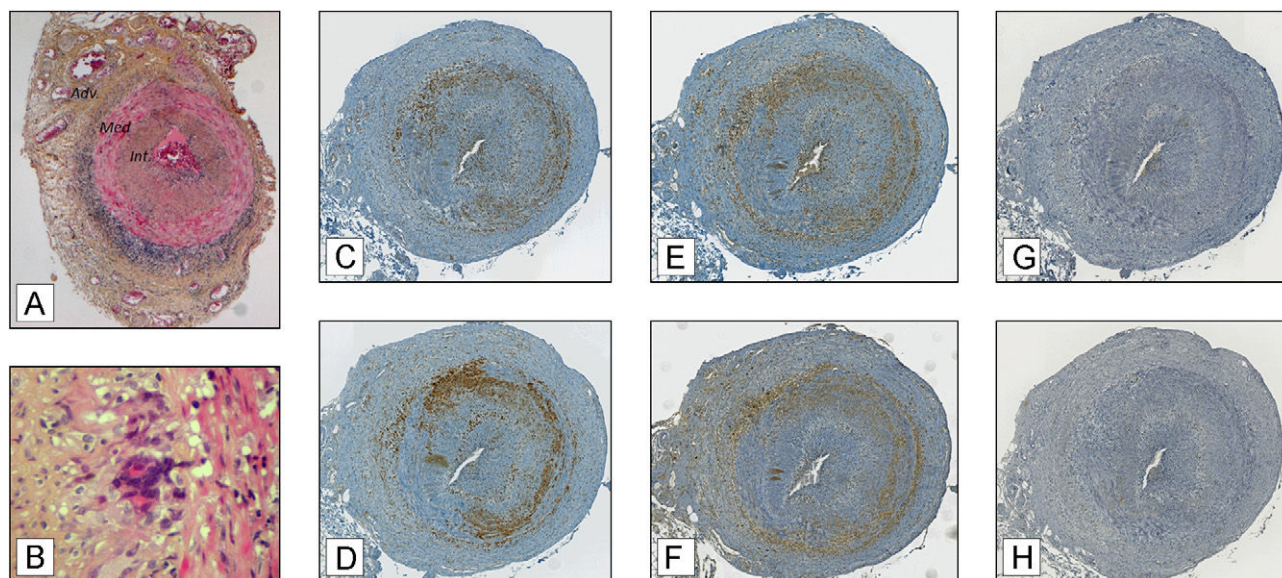


FIGURE 1

**Biopsie d'artère temporale au cours de la maladie de Horton (MH)**

A, B. Biopsie d'artère temporale d'un patient atteint de MH. Coloration au May Grünwald Giemsa. Fragmentation de la média et hyperplasie intimale responsable d'une sténose de la lumière vasculaire. Panartérite avec infiltrat constitué de cellules mononucléées prédominant à la jonction adventice/média et présence de cellules géantes multinucléées (B). C, D, E, F, G, H. Étude immunohistochimique de l'infiltrat cellulaire affectant la paroi artérielle d'une artère temporale de patient atteint de MH. Toutes les coupes de l'artère temporale ont été réalisées au niveau de la même lésion. Les cellules positives marquées par les différents anticorps utilisés apparaissent colorées en brun : CD3 pour les LT (C), CD68 pour les MP (D), IFN- $\gamma$  pour les LTh1 (E), IL-17 pour les LTh17 (F), Foxp3 pour les Treg (G) et CD20 pour les lymphocytes B (H). Adv : adventice ; Med : média ; Int : intima. Grossissement :  $\times 40$ .

de cellules géantes multinucléées. Les lymphocytes B sont quasi-inexistants dans la paroi artérielle (figure 1). Cependant, 50 % seulement des biopsies de l'artère temporale (BAT) ont cet aspect typique. Dans les autres biopsies, l'infiltrat inflammatoire chronique est constitué de lymphocytes et de quelques polynucléaires neutrophiles ou éosinophiles sans cellules géantes. Il faut noter qu'il n'existe jamais de nécrose au cours de la MH. L'observation de lésions de nécrose fibrinoïde affectant la paroi de l'artère temporale ou les vasa vasorum doit faire exclure le diagnostic de MH. La topographie des atteintes rend compte des manifestations ischémiques de la maladie : céphalées, claudication de la mâchoire, baisse d'activité visuelle, nécrose du scalp ou de la langue et manifestations neurologiques centrales. Ces manifestations ischémiques s'accompagnent de signes généraux (asthénie, fièvre, perte de poids, anorexie), reflet de l'intense réaction inflammatoire associée. La MH s'associe dans 27 à 56 % à un tableau de pseudopolyarthrite rhizomélique (PPR), dont la physiopathologie est commune avec celle de la MH [19]. Le traitement de la MH est une corticothérapie prolongée par voie orale. Ce traitement est efficace mais son sevrage est long. La durée de traitement, de 18 mois en moyenne, explique l'importante morbi-mortalité due à la corticothérapie prolongée [20].

Cette revue décrit de façon détaillée les avancées dans la connaissance de la physiopathologie et plus particulièrement de l'immunopathologie de l'ACG qui permettent d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

**Modèle physiopathologique de l'artérite à cellule géantes**

La MH affecte les artères de gros calibre, principalement l'aorte et les artères supra-aortiques, qui possèdent une importante limitante élastique interne (LEI) et des vasa vasorum, vaisseaux de très petit calibre cheminant dans l'adventice pour assurer la vascularisation de la paroi artérielle. À l'inverse, les artères intracrâniennes ont une paroi plus fine, avec moins de tissu élastique et pas de vasa vasorum. Ces différences anatomiques expliquent que ces artères soient exceptionnellement atteintes au cours de la MH [21].

**Les 3 phases de la physiopathologie de la maladie de Horton**

Le modèle physiopathologique de la MH peut se diviser en 3 phases (figure 2) :

- la rupture de tolérance et l'activation des cellules dendritiques (DC) ;

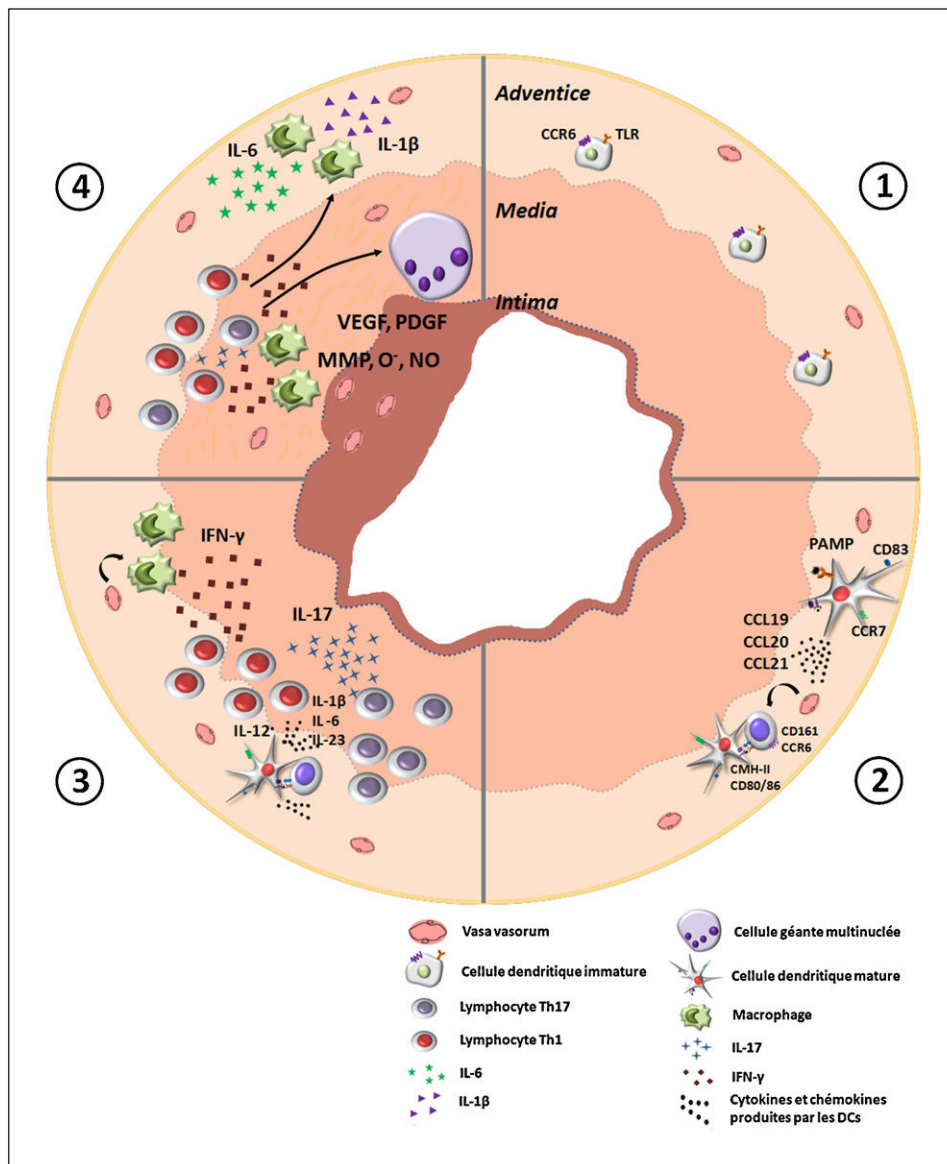


FIGURE 2

**Modèle physiopathologique de la maladie de Horton**

1. Artère normale : les cellules dendritiques (DC) résidentes de l'adventice sont à l'état immature. Elles expriment CCR6 et des TLR dont la nature varie en fonction du type d'artère. 2. Activation des DC par un signal « Danger » (PAMP : *pathogen associated molecular pattern*) par l'intermédiaire des TLR. Les DC changent de morphologie, expriment CCR7 et CD83 et produisent des chimiokines (CCL19, CCL20 et CCL21) qui vont recruter les LT CD4 via les vasa vasorum et piéger les DC dans la paroi artérielle. Les DC expriment fortement le CMH-II et les molécules de costimulation CD80 et CD86, ce qui leur permet d'activer les LT CD4 reconnaissant l'antigène qu'elles ont apprêté au sein de leurs molécules de CMH-II. 3. Infiltration lymphocytaire T oligoclonale et polarisation Th1 et Th17. Les DC produisent des cytokines qui vont favoriser la polarisation des LT en LTh1 et LTh17. En présence d'IL-12, les LT CD4 se polarisent en LTh1 producteurs d'IFN- $\gamma$ . En présence d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et d'IL-23, les LT CD4 se polarisent en LTh17 producteurs d'IL-17. Les macrophages (MP) infiltrés à leur tour l'adventice et sont activés par les cytokines lymphocytaires, notamment l'IFN- $\gamma$ . 4. Les MP de l'adventice produisent de grandes quantités d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 qui sont responsables des signes généraux de la MH et qui vont entretenir des boucles d'amplification aboutissant à la pérennisation de la réponse inflammatoire. Dans la média, les MP et les cellules géantes produisent des facteurs de croissance : le VEGF provoque une néoangiogenèse qui va accroître le recrutement des cellules inflammatoires, le PDGF est responsable de la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses aboutissant à l'hyperplasie intimale. Sont aussi produits des métalloprotéases (MMP), du monoxyde d'azote (NO) et des radicaux libres oxygénés (O $^{\cdot-}$ ) qui vont détruire la média et la limitante élastique interne. Ce remodelage vasculaire est à l'origine des manifestations ischémiques de la MH. DC : cellule dendritique ; CCL : chimiokines ; CCR : récepteur de chimiokine de la famille CC ; CMH-II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II ; IFN- $\gamma$  : interféron-gamma ; IL : interleukine ; LT : lymphocyte T ; MMP : métalloprotéases ; MP : macrophage ; PAMP : *pathogen associated molecular pattern* ; PDGF : *platelet-derived growth factor* ; RO : radicaux libres oxygénés ; TLR : *toll like receptor* ; VEGF : *vascular endothelial growth factor*.

- le recrutement, l'activation et la polarisation des LT ;
- le recrutement des MP et le remodelage vasculaire.

### Rupture de tolérance et activation des cellules dendritiques résidentes de l'adventice

Dans l'adventice des artères saines se trouvent des DC myéloïdes à l'état immature, définies par un phénotype  $S100^+CD11c^+CCR6^+CD83^-CMH-II^{low}$  [22–25]. Comme dans tous les autres tissus, ces DC immatures ont un rôle de sentinelle et phagocytent les antigènes de l'environnement proche. Elles participent à l'induction de tolérance vis-à-vis de ces antigènes et à l'immunoprotection dont bénéficie la paroi artérielle. Lorsqu'elles reçoivent un signal « Danger », par le biais de récepteurs spécialisés que sont les *Toll Like Receptor* (TLR), les DC acquièrent un phénotype mature ( $S100^+CD11c^+CCR7^+CD83^+CD80/86^+CMH-II^{high}$ ) et produisent alors des cytokines et des chémokines qui sont responsables du recrutement et de la polarisation des LT. La nature du signal « Danger » n'est pas connue avec précision mais l'hypothèse infectieuse est la plus probable [15–17]. Une forte expression du CMH-II et de molécules de costimulation (CD80 et CD86) va permettre aux DC devenues matures d'activer les LT recrutés dans la paroi artérielle. Au cours de la PPR, les DC acquièrent aussi un phénotype mature mais infiltrent uniquement l'adventice alors qu'au cours de la MH, les DC infiltrent toutes les tuniques artérielles [24,25].

En utilisant un modèle murin humanisé de MH dans lequel des artères temporales humaines sont greffées dans des souris affectées de déficit immunitaire sévère (SCID), l'équipe de C. Weyand a montré que la déplétion en cellules  $CD83^+$  (DC matures) permettait de diminuer les lésions de vascularite, l'infiltrat lymphocytaire T et la production d'interféron-gamma ( $IFN-\gamma$ ), démontrant ainsi le rôle primordial des DC de l'adventice dans la physiopathologie de la MH [25]. L'injection de  $TNF-\alpha$ , d'adjuvant complet de Freund (ligand du TLR2) ou de lipopolysaccharide (LPS) (ligand de TLR4) induisait l'activation des DC immatures des artères de sujets sains greffées aux souris SCID. Par la suite, les LT autologues transférés étaient recrutés dans la paroi artérielle et étaient responsables du développement de la vascularite [25]. Parmi les différents signaux « Danger » testés, le LPS, ligand du TLR4, avait permis d'obtenir la plus forte activation des DC : expression d'un phénotype mature ( $CD83^+$ ), forte production de chémokines (CCL18, CCL19 et CCL21) et de cytokines (IL-18) [25].

L'expression des TLR dans la paroi des artères humaines saines et de gros calibre a été étudiée chez 37 patients de façon post-mortem [26]. Les TLR sont exprimés de façon quasi-exclusive par les DC myéloïdes qui se situent à la jonction adventice/média. Dans toutes les artères, la plupart des TLR (TLR1 à 9) sont exprimés : TLR2 et 4 de façon ubiquitaire, TLR7 et 9 de façon inconstante, alors que les TLR1, 3, 5, 6 et 8 sont exprimés de façon variable, conférant une véritable carte d'identité à chaque territoire artériel. Le profil d'expression des TLR de l'artère

temporale est différent de celui des autres gros vaisseaux : les TLR2, 4 et 8 sont fortement exprimés dans l'artère temporale à l'inverse des TLR1, 5 et 6 dont l'expression est faible. L'aorte et surtout la carotide sont deux artères dont le profil d'expression des TLR est le plus proche de celui de l'artère temporale. Ces données pourraient expliquer le tropisme de la MH pour le territoire carotidien externe [26].

À la différence d'une réponse immunitaire classique, les DC matures ne migrent pas dans le ganglion de drainage satellite de l'artère au cours de la MH. Elles sécrètent les chémokines CCL19 et CCL21 et expriment leur récepteur (CCR7), ce qui a pour effet de les piéger dans l'adventice [24].

### Recrutement des LT $CD4^+$ et leur polarisation

La déplétion en LT  $CD4^+$  dans le modèle de souris SCID greffées avec des artères de sujet atteint de MH entraîne une diminution des lésions de vascularite, alors que cet infiltrat se maintient indéfiniment en l'absence de déplétion [27]. Ces résultats sont en faveur d'un rôle essentiel des LT  $CD4^+$  dans la physiopathologie de la MH. L'analyse du réarrangement du gène du TCR des LT  $CD4^+$  infiltrant la paroi des artères de sujets atteints de MH a mis en évidence une restriction oligoclonale du répertoire T. Ces résultats suggèrent fortement l'existence d'une présentation antigénique par les DC matures aux LT  $CD4^+$  qui vont ensuite proliférer de façon clonale [28–30]. De plus, des clones identiques de LT  $CD4^+$  ont été isolés des BAT droite et gauche chez des patients atteints de MH [30].

Les LT  $CD4^+$  sont absents des parois des artères de sujets sains. Les LT  $CD4^+$  sont recrutés suite à l'activation et la maturation des DC de l'adventice qui produisent certaines chémokines : CCL18, CCL19, CCL20 et CCL21 [17,23]. Les LT  $CD4^+$  infiltrent d'abord l'adventice, via les vasa vasorum qui expriment fortement les molécules d'adhésion nécessaires à la diapédèse : *intracellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) et *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) [17,23].

Il a été montré que la nature du signal danger activant les DC de l'adventice influait sur la nature des chémokines et des LT  $CD4^+$  qui infiltrent la paroi artérielle. Ainsi, l'activation par un ligand du TLR4 (LPS), favorise la production de CCL20 qui provoque une infiltration par des LT  $CD4^+$  exprimant CCR6, le récepteur de CCL20. Ces LT  $CD4^+CCR6^+$  prolifèrent et infiltrent toutes les tuniques artérielles aboutissant à une panartérite [31]. De façon intéressante, CCR6 est un récepteur fortement exprimé par les LT *helper* 17 (LTh17), à la différence des LTh1 qui expriment CXCR3, le récepteur des chémokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11 [32]. À l'inverse, l'activation des DC par un ligand de TLR5 provoque une infiltration par des LT  $CD4^+CCR6^-$  qui n'envahissent pas toutes les tuniques de l'artère et provoquent simplement une périartérite [31].

Une fois recrutés dans la paroi artérielle, les LT  $CD4^+$  sont activés par les DC qui leur présentent un antigène dont la nature est actuellement inconnue. L'environnement cytokinique local,

riche en IL-12, IL-18, IL-23, IL-6 et IL-1 $\beta$  va favoriser la polarisation lymphocytaire Th1 et Th17. Les LTh1, générés en présence d'IL-12 et d'IL-18, produisent de l'IFN- $\gamma$  alors que les LTh17 se polarisent en présence d'IL-6, d'IL-1 $\beta$  et d'IL-23 et produisent de l'IL-17. L'IL-17 est une cytokine fortement pro-inflammatoire qui a été récemment impliquée dans plusieurs maladies auto-immunes et auto-inflammatoires telles que la sclérose en plaques, la maladie de Crohn ou la polyarthrite rhumatoïde [33,34]. Le pourcentage de LTh17 circulants est augmenté dans le sang des patients atteints de MH comparativement à des sujets sains [35–38]. La paroi artérielle des patients atteints de MH est massivement infiltrée par les LTh1 et les LTh17 (*figure 1*). La sensibilité aux corticoïdes est différente pour ces deux sous-populations lymphocytaires. Sous l'effet de la corticothérapie, le pourcentage de LTh17 et leur présence dans la paroi artérielle diminuent significativement alors qu'aucune modification n'est notée concernant les LTh1. En effet, la corticothérapie entraîne une diminution de l'expression des cytokines Th17 (IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-23) mais ne modifie pas la production de cytokines Th1 (IL-12) par les monocytes circulants et infiltrant les artères de sujets atteints de MH [35]. C. Weyand a émis l'hypothèse que deux voies distinctes d'activation lymphocytaire T, impliquant deux types de DC, interviendraient dans la MH. Une première voie, impliquant des DC productrices d'IL-6, d'IL-23 et d'IL-1 $\beta$ , aboutirait à une polarisation Th17, à la production d'IL-17 qui activerait les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes. Cette voie serait inhibée par la corticothérapie. À l'inverse, une voie Th1 impliquant des DC productrices d'IL-12 et d'IL-18 aboutirait à la production d'IFN- $\gamma$  activant les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules cytotoxiques. Cette voie Th1, indépendante de la précédente, serait résistante à la corticothérapie et à l'origine des manifestations vasculaires chroniques de la MH [35,39]. Cette hypothèse impliquant deux voies distinctes n'est probablement que partiellement vraie puisque la différenciation lymphocytaire Th1, Th17 ou Treg n'est pas un processus définitif, ces sous-populations pouvant se redifférencier en d'autres sous-types lymphocytaires, ce qui définit le concept de plasticité [40–42]. Plutôt que l'existence de deux voies distinctes dérivant de deux types de DC, l'hypothèse la plus probable est qu'il n'y ait qu'un type de DC et que les LTh17 se différencient secondairement en LTh1 en raison de la persistance d'une production d'IL-12 malgré la corticothérapie [40]. Des arguments en faveur de cette hypothèse ont été apportés par des travaux utilisant un modèle expérimental de colite inflammatoire dans lequel les LTh17, par le biais de la production d'IL-17, induisaient la sécrétion d'IL-12 et d'IL-23 par les cellules muqueuses résidentes, aboutissant alors à la différenciation des LTh17 en LTh1 producteurs d'IFN- $\gamma$  [43]. Les LTh17 sont donc capables d'induire leur propre polarisation en LTh1 et il est donc possible que la « disparition » des LTh17 de la paroi des artères

de patients atteints de MH au profit des LTh1 corresponde à l'histoire naturelle de la MH. Confortant cette hypothèse, nos travaux récents montrent que les LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>, précurseurs des LTh17 chez l'homme [44], sont fonctionnellement modifiés au cours de la MH, se différenciant préférentiellement en LTh17 en comparaison à ceux des sujets sains [36]. Ces LT CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> infiltrent de façon massive la paroi artérielle au cours de la MH et produisent à la fois de l'IL-17 et de l'IFN- $\gamma$ . CD161, molécule de la famille des lectines, est un marqueur spécifique de la lignée Th17 [32,44]. Aussi, l'expression de ce marqueur par des LTh1 dans les BAT de sujets atteints de MH suggère fortement que ces LTh1 se sont différenciés à partir de LTh17 par plasticité [36], comme cela a été récemment mis en évidence au cours de l'arthrite juvénile [45].

À l'inverse des LTh1 et des LTh17 pro-inflammatoires, sont décrits des LT immunorégulateurs : les Treg, définis par le phénotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> [46]. Les Treg sont quasi-absents de l'infiltrat lymphocytaire T présent dans la paroi artérielle au cours de la MH (*figure 1*) et leur pourcentage est diminué dans le sang circulant des patients atteints de MH. En revanche, leur fonction suppressive n'est pas altérée. Ce déficit quantitatif de la réponse T régulatrice, incapable de contrebalancer les réponses Th1 et Th17, favorise probablement la pérennisation de la réaction inflammatoire au cours de la MH [36].

### Remodelage vasculaire

Deux aspects de la physiopathologie de la MH expliquent les symptômes : l'intense réaction inflammatoire responsable des signes généraux et le remodelage vasculaire responsable des manifestations ischémiques de la maladie [47].

L'importante infiltration par des LTh1 et des LTh17 est responsable de la production de grandes quantités d'IL-17 et d'IFN- $\gamma$ . Le rôle de l'IL-17, plus récemment mise en évidence, est moins bien connu que celui de l'IFN- $\gamma$  dans la MH. L'IFN- $\gamma$  active les MP recrutés dans la paroi artérielle. Cette activation chronique va entraîner la formation de cellules géantes multinucléées, caractéristiques de la MH. CCL2, ligand de CCR2 semble jouer un rôle primordial dans le recrutement des MP au cours de la MH [48,49]. CCL2 est produite non seulement par les leucocytes infiltrant la paroi artérielle, notamment dans les lésions granulomateuses, mais aussi par les cellules musculaires lisses (CML) de la média [48]. L'hypothèse d'un rôle important de CCL2 dans la physiopathologie de la MH est confortée par la corrélation entre la survenue de rechutes de MH au cours de la première année de suivi et le niveau d'expression de CCL2 dans la paroi artérielle [48].

Les MP situés dans l'adventice, stimulés par l'IFN- $\gamma$ , vont produire des cytokines inflammatoires, l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6, qui amplifient la réponse inflammatoire locale et sont à l'origine des signes généraux de la MH : asthénie, fièvre, amaigrissement, anorexie et élévation des protéines de l'inflammation [17,23,50–52].



Les MP infiltrant la média, activés par l'IFN- $\gamma$ , synthétisent des composants délétères pour la paroi artérielle, notamment des radicaux libres dérivés de l'oxygène à l'origine de phénomènes de peroxydation lipidique, du monoxyde d'azote produit par la NO-synthase inductible et à l'origine de la nitratation des protéines endothéliales et des métalloprotéases (MMP) à l'origine de la destruction de la matrice extra-cellulaire et de la fragmentation de la LEI [17,47]. Les MMP sont des enzymes protéolytiques capables de digérer l'élastine et sont à l'origine de la destruction de la média. Seules les MMP-2 et MMP-9 sont détectées dans la paroi des artères affectées de MH, principalement au niveau des MP et des cellules géantes situés dans les granulomes à proximité de la LEI [53–55]. Dans une large étude comparant 50 BAT de sujets atteints de MH à 97 BAT normales, seule la MMP-9 était associée à la fragmentation de la LEI, l'hyperplasie intimale et la sténose de la lumière vasculaire alors que la MMP-2 était détectée de façon identique entre les deux groupes [56].

Les MP activés par l'IFN- $\gamma$  et les cellules géantes vont également produire des facteurs de croissance : le *platelet-derived growth factor* (PDGF) et le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) [57]. Le PDGF provoque l'activation et la prolifération des CML à l'origine de l'hyperplasie intimale. Le VEGF aboutit à une importante néovascularisation favorisant le recrutement de nouvelles cellules immunitaires dans la paroi artérielle [58].

Les CML de la média sont des composants majeurs de la paroi artérielle. Elles ont une fonction contractile et participent aux phénomènes de réparation tissulaire grâce à leur capacité de migration et de prolifération [31]. Au cours de la MH, les MP et les LT s'accumulent dans la média où les CML constituent la cible directe des médiateurs toxiques produits par les LT et les MP. Les CML ne sont pas seulement des cibles du processus inflammatoire mais participent activement à sa génération et à son entretien : les CML de la média et celles qui ont migré et proliféré dans l'intima produisent des MMP-2 et MMP-9, à l'origine de la destruction de la média et de la fragmentation de la LEI [31,59]. Les phénomènes de néoangiogenèse et d'hyperplasie intimale sont directement responsables des manifestations ischémiques de la maladie [58]. Les vasa vasorum, normalement confinés à l'adventice, sont également présents dans la média et l'intima au cours de la MH et leur présence est corrélée avec la fragmentation de la LEI et la présence de cellules géantes. En effet, les facteurs de croissance produits par les MP et les cellules géantes (PDGF et VEGF) favorisent la prolifération et la migration des CML vers l'intima à l'origine des phénomènes de néoangiogenèse et d'hyperplasie intimale [57]. La MMP-9 est détectée au niveau des CML de la média et joue probablement un rôle fondamental dans les processus d'invasion de l'intima par les CML, en facilitant la destruction de la LEI et la dissociation des CML [31].

Les cellules endothéliales (CE), qui constituent une barrière entre le compartiment sanguin et les tissus, jouent un rôle crucial dans la régulation de la vasomotricité, de l'hémostase,

de l'angiogenèse et des phénomènes inflammatoires. Les molécules produites par les LT et les MP au cours de la MH agissent sur les CE qui sécrètent à leur tour des cytokines et expriment des molécules d'adhésion qui vont contribuer au recrutement de cellules immunitaires. En effet, l'analyse des vasa vasorum et des néovaisseaux issus de biopsies d'artère temporale de patients affectés de MH a mis en évidence une forte expression de molécules d'adhésion ICAM-1, ICAM-2, P-selectine, E-sélectine et VCAM-1 par les leucocytes et les CE [60]. De plus, la concentration sérique d'ICAM-1 soluble est corrélée à l'activité de la MH [61].

### Rôle de la réponse immunitaire humorale

Dans une moindre mesure que la réponse immunitaire à médiation cellulaire, il est possible que la réponse immunitaire humorale soit également impliquée dans la physiopathologie de la MH. En effet, quelques lymphocytes B sont parfois détectés dans les BAT de patients atteints de MH, en particulier dans l'adventice (*Figure 1H*) [36,62,63] où ils sont associés à des plasmocytes, notamment chez les patients ayant une atteinte visuelle [64]. Témoignant du possible rôle de l'immunité humorale, la présence de différents types d'auto-anticorps a été rapportée au cours de la MH mais sans que leurs rôles pathogéniques soient clairement démontrés. Ainsi, des anticorps anti-cardiolipines (aCL) ont été détectés chez 20 à 50 % des patients affectés de MH, mais à taux faible, sans anticorps anti- $\beta$ 2glycoprotéine I et sans association avec une augmentation du risque ischémique [65–69]. Ces aCL disparaissent après 3 mois de corticothérapie [69,70]. Des anticorps anti-cellules endothéliales (aCE) ont été détectés chez 33 % des patients atteints de MH [71]. Ces aCE ne sont pas spécifiques de la MH car ils ont été aussi trouvés chez des sujets sains [72] ou atteints de maladie auto-immune [73]. Cependant, au cours de la MH, ces aCE seraient des IgG dirigées contre des auto-antigènes spécifiques exprimés par les CE et les CML, tels que la vinculine, la lamine A/C, l'annexine V, le voltage dépendant anion-selective channel protein 2 (VDCA-2) et d'autres protéines impliquées dans le métabolisme énergétique cellulaire [74]. Plus récemment, des anticorps dirigés contre la chaîne lourde de la ferritine humaine ont été détectés chez 92 % des patients affectés de MH ou de PPR non traitée, mais aussi chez 29 % des patients affectés de lupus et seulement 1 % des sujets sains [75].

### Rôle du vieillissement dans la physiopathologie de la maladie de Horton

L'âge constitue le principal facteur de risque de développer une MH. Le processus de vieillissement s'accompagne d'une modification du système immunitaire inné et adaptatif et d'un remodelage de la paroi vasculaire [76]. Tous les acteurs cellulaires impliqués dans la MH sont affectés par le vieillissement : DC, LT, CE et CML [76]. Le vieillissement est responsable d'une diminution du nombre de LT naïfs et d'un enrichissement en LT

mémoires et effecteurs, d'une diminution de la diversité du répertoire T et d'une accumulation de LT CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> et CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> qui sont des LT sénescents dont la fréquence est inversement corrélée à la réponse vaccinale [77–80]. Les DC sont également modifiées par le processus de vieillissement : l'expression des TLR est maintenue mais la réponse suite à leur stimulation est diminuée et la migration des DC vers les organes lymphoïdes secondaires est altérée [81,82]. Parallèlement, les sujets âgés sont davantage exposés aux infections : augmentation de la charge infectieuse et réactivation d'infections latentes virales ou bactériennes. Les cellules immunitaires survivant à ce processus de vieillissement sont moins bien régulées et produisent spontanément des cytokines. En effet, une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$ ) par les DC, les MP, les CE et les fibroblastes sénescents a été observée [76,83]. Ce phénomène, dénommé « inflamm-aging », serait à l'origine d'un état inflammatoire chronique facilitant le développement de maladies auto-immunes et de l'athérosclérose au cours du vieillissement. En effet, la MH est caractérisée par le développement d'une réaction immunitaire non contrôlée, médiée par les DC et les LT, dans un tissu normalement immunoprotégé qu'est la paroi artérielle. Avec le vieillissement, le tissu vasculaire subit des modifications (dégénérescence de la média, dépôts calciques, hyperplasie intimale, altération des fibres élastiques, altération des protéines de la matrice [84–87]) qui, combinées à cet état pro-inflammatoire, favoriseraient la présentation d'auto-antigènes aux LT par les DC et donc le déclenchement de la MH [76].

### IL-6 : une cytokine clé et une cible thérapeutique au cours de la maladie de Horton

Le rôle de l'IL-6 est particulièrement important dans la physiopathologie de la MH. Cette cytokine intervenant dans la promotion de la phase aiguë de la réaction inflammatoire est augmentée dans le sérum de patients atteints de MH non traitées ; sa concentration est corrélée avec l'activité de la maladie ainsi qu'avec la vitesse de sédimentation et la protéine

C réactive (CRP) et elle diminue dans le sérum des patients traités [36,52,88]. L'IL-6 est une cytokine clé de la différenciation des lymphocytes Th17 et de la régulation de la balance Th17/Treg. Son excès favorise la réponse Th17 au dépens de la réponse Treg [89,90]. Au cours de la MH, l'excès d'IL-6 privilégie donc la différenciation Th17 au dépens de la différenciation Treg [35,36,38].

La corticothérapie, traitement de référence de la MH, permet de diminuer la concentration d'IL-6 et la réponse Th17 [35,36,38] mais ne restaure pas une réponse T régulatrice normale, ce qui joue probablement un rôle dans la survenue de la corticodépendance et des rechutes au cours de la décroissance de la corticothérapie [36,37]. Au cours de la polyarthrite rhumatoïde, l'inhibition de la voie de l'IL-6 par le tocilizumab, un anticorps dirigé contre le récepteur de l'IL-6 (IL-6R), est capable de diminuer la réponse Th17, comme les corticoïdes, mais aussi d'augmenter la réponse T régulatrice, ces modifications des sous-populations lymphocytaires étant corrélées à la rémission clinique de la PR [91].

Le blocage de la voie de l'IL-6 semble donc une cible thérapeutique de choix au cours de la MH. Chez plusieurs patients atteints de MH ou de maladie de Takayasu, un traitement par tocilizumab utilisé, soit d'emblée, soit en cas de maladie réfractaire, a permis d'obtenir la rémission de la maladie. Aucun effet indésirable sévère n'a été observé mais le suivi était court dans toutes les études (5,1 à 8,3 mois) [92–95].

## Conclusion

La cause exacte de la MH demeure inconnue mais les mécanismes immunopathologiques aboutissant au remodelage vasculaire sont de mieux en mieux connus et permettent aujourd'hui d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques qui permettront peut-être de diminuer la dose et la durée de la corticothérapie reçue par ces malades, encore responsable d'une importante morbi-mortalité.

**Déclaration d'intérêts :** les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

## Références

- [1] Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL *et al.* Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum* 1994;37:187-92.
- [2] Chaudhry IA, Shamsi FA, Elzaridi E, Arat YO, Bosley TM, Riley FC. Epidemiology of giant-cell arteritis in an Arab population: a 22-year study. *Br J Ophthalmol* 2007;91:715-8.
- [3] Lee JL, Naguwa SM, Cheema GS, Gershwin ME. The geo-epidemiology of temporal (giant-cell) arteritis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008;35:88-95.
- [4] Lugo JZ, Deitch JS, Yu A, Jang JH, Patel R, Slova D *et al.* Demographic and laboratory data may predict positive temporal artery biopsy. *J Surg Res* 2011;170:332-5.
- [5] Pereira LS, Yoon MK, Hwang TN, Hong JE, Ray K, Porco T *et al.* Giant-cell arteritis in Asians: a comparative study. *Br J Ophthalmol* 2011;95:214-6.
- [6] Shah A, Jain S. Epidemiology of giant-cell arteritis in an Arab population: a 22-year study. Ethnic variation in incidence of giant-cell arteritis. *Br J Ophthalmol* 2008;92:724-5.
- [7] Salvarani C, Crowson CS, O'Fallon WM, Hunder GG, Gabriel SE. Reappraisal of the epidemiology of giant-cell arteritis in Olmsted County, Minnesota, over a fifty-year period. *Arthritis Rheum* 2004;51:264-8.
- [8] Barrier JH, Billaud E, Magadur G. Respective prevalences and frequencies of Horton's disease and rhizomelic pseudopolyarthritis. Epidemiological study in the Loire-Atlantic department using a general practice research network (RESOMED 44). *Rev Med Interne* 1992;13:393-6.

- [9] Combe B, Sany J, Le Quellec A, Clot J, Eliaou JF. Distribution of HLA-DRB1 alleles of patients with polymyalgia rheumatica and giant-cell arteritis in a Mediterranean population. *J Rheumatol* 1998;25:94-8.
- [10] Weyand CM, Hicok KC, Hunder GG, Goronzy JJ. The HLA-DRB1 locus as a genetic component in giant-cell arteritis. Mapping of a disease-linked sequence motif to the antigen binding site of the HLA-DR molecule. *J Clin Invest* 1992;90:2355-61.
- [11] Gonzalez-Gay MA. Genetic epidemiology. Giant-cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Arthritis Res* 2001;3:154-7.
- [12] Flores-Dominguez C, Hernandez-Pacheco G, Zuniga J, Gamboa R, Granados J, Reyes PA *et al.* [Alleles of the major histocompatibility system associated with susceptibility to the development of Takayasu's arteritis]. *Gac Med Mex* 2002;138:177-83.
- [13] Gonzalez-Gay MA, Hajeer AH, Dababneh A, Garcia-Porrua C, Matvey DL, Amoli MM *et al.* IL-6 promoter polymorphism at position -174 modulates the phenotypic expression of polymyalgia rheumatica in biopsy-proven giant-cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:179-84.
- [14] Gonzalez-Gay MA, Hajeer AH, Dababneh A, Garcia-Porrua C, Amoli MM, Thomson W *et al.* Corticotropin releasing hormone promoter polymorphisms in giant-cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:133-8.
- [15] Duhaut P, Bosshard S, Ducroix JP. Is giant-cell arteritis an infectious disease? Biological and epidemiological evidence. *Presse Med* 2004;33:1403-8.
- [16] Salvarani C, Cantini F, Hunder GG. Polymyalgia rheumatica and giant-cell arteritis. *Lancet* 2008;372:234-45.
- [17] Ly KH, Regent A, Tamby MC, Mouthon L. Pathogenesis of giant-cell arteritis: more than just an inflammatory condition? *Autoimmun Rev* 2010;9:635-45.
- [18] Agard C, Barrier JH, Dupas B, Ponge T, Mahr A, Fradet G *et al.* Aortic involvement in recent-onset giant cell (temporal) arteritis: a case-control prospective study using helical aortic computed tomodensitometric scan. *Arthritis Rheum* 2008;59:670-6.
- [19] Borchers AT, Gershwin ME. Giant-cell arteritis: a review of classification, pathophysiology, geo-epidemiology and treatment. *Autoimmun Rev* 2012;11:A544-54.
- [20] Proven A, Gabriel SE, Orces C, O'Fallon WM, Hunder GG. Glucocorticoid therapy in giant-cell arteritis: duration and adverse outcomes. *Arthritis Rheum* 2003;49:703-8.
- [21] Salvarani C, Giannini C, Miller DV, Hunder G. Giant-cell arteritis: involvement of intracranial arteries. *Arthritis Rheum* 2006;55:985-9.
- [22] Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.
- [23] Weyand CM, Goronzy JJ. Medium- and large-vessel vasculitis. *N Engl J Med* 2003;349:160-9.
- [24] Krupa WM, Dewan M, Jeon MS, Kurtin PJ, Younge BR, Goronzy JJ *et al.* Trapping of misdirected dendritic cells in the granulomatous lesions of giant-cell arteritis. *Am J Pathol* 2002;161:1815-23.
- [25] Ma-Krupa W, Jeon MS, Spoerl S, Tedder TF, Goronzy JJ, Weyand CM. Activation of arterial wall dendritic cells and breakdown of self-tolerance in giant-cell arteritis. *J Exp Med* 2004;199:173-83.
- [26] Pryshchep O, Ma-Krupa W, Younge BR, Goronzy JJ, Weyand CM. Vessel-specific toll like receptor profiles in human medium and large arteries. *Circulation* 2008;118:1276-84.
- [27] Brack A, Geisler A, Martinez-Taboada VM, Younge BR, Goronzy JJ, Weyand CM. Giant-cell vasculitis is a T cell-dependent disease. *Mol Med* 1997;3:530-43.
- [28] Martinez-Taboada VM, Hunder NN, Hunder GG, Weyand CM, Goronzy JJ. Recognition of tissue residing antigen by T cells in vasculitic lesions of giant-cell arteritis. *J Mol Med (Berl)* 1996;74:695-703.
- [29] Martinez-Taboada VM, Goronzy JJ, Weyand CM. Clonally expanded CD8 T cells in patients with polymyalgia rheumatica and giant-cell arteritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;79:263-70.
- [30] Weyand CM, Schonberger J, Oppitz U, Hunder NN, Hicok KC, Goronzy JJ. Distinct vascular lesions in giant-cell arteritis share identical T cell clonotypes. *J Exp Med* 1994;179:951-60.
- [31] Piggott K, Bioussé V, Newman NJ, Goronzy JJ, Weyand CM. Vascular damage in giant-cell arteritis. *Autoimmunity* 2009;42:596-604.
- [32] Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunol* 2008;20:1361-8.
- [33] Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009;361:888-98.
- [34] Samson M, Lakomy D, Audia S, Bonnotte B. Les lymphocytes  $T_H17$  : différenciation, phénotype, fonctions, et implications en pathologie et thérapeutique humaine. *Rev Med Interne* 2011;32(5):292-301.
- [35] Deng J, Younge BR, Olshen RA, Goronzy JJ, Weyand CM. Th17 and Th1 T-cell responses in giant-cell arteritis. *Circulation* 2010;121:906-15.
- [36] Samson M, Audia S, Fraszczak J, Trad M, Ornetti P, Lakomy D *et al.* Th1 and Th17 lymphocytes expressing CD161 are implicated in giant-cell arteritis and polymyalgia rheumatica pathogenesis. *Arthritis Rheum* 2012 (sous presse).
- [37] Samson M, Audia S, Lakomy D, Trad M, Devilliers H, Vinit J *et al.* Balance Th17/Treg au cours de la maladie de Horton et la Pseudopolyarthrite rhizomélisque : une nouvelle cible thérapeutique ? *Rev Med Interne* 2010;31:5358.
- [38] Terrier B, Geri G, Chahra W, Allenbach Y, Rosenzweig M, Costedoat-Chalumeau N *et al.* IL-21 modulates Th1 and Th17 responses in giant-cell arteritis. *Arthritis Rheum* 2012. <http://dx.doi.org/10.1002/art.34327>.
- [39] Weyand CM, Younge BR, Goronzy JJ. IFN-gamma and IL-17: the two faces of T-cell pathology in giant-cell arteritis. *Curr Opin Rheumatol* 2011;23:43-9.
- [40] Annunziato F, Romagnani S. Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Res Ther* 2009;11:257.
- [41] Peck A, Mellins ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology* 2010;129:147-53.
- [42] Zhu J, Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* 2010;20:4-12.
- [43] Feng T, Qin H, Wang L, Benveniste EN, Elson CO, Cong Y. Th17 cells induce colitis and promote Th1 cell responses through IL-17 induction of innate IL-12 and IL-23 production. *J Immunol* 2011;186:6313-8.
- [44] Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F *et al.* Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+ CD4+ T cell precursor. *J Exp Med* 2008;205:1903-16.
- [45] Cosmi L, Cimaz R, Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Borriello F *et al.* Evidence of the transient nature of the Th17 phenotype of CD4+ CD161+ T cells in the synovial fluid of patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2011;63:2504-15.
- [46] Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 2008;9:239-44.
- [47] Weyand CM, Goronzy JJ. Giant-cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Ann Intern Med* 2003;139:505-15.
- [48] Cid MC, Hoffman MP, Hernandez-Rodriguez J, Segarra M, Elkin M, Sanchez M *et al.* Association between increased CL2 (MCP-1) expression in lesions and persistence of disease activity in giant-cell arteritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:1356-63.
- [49] Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 1997;90:909-28.
- [50] Hernandez-Rodriguez J, Segarra M, Vilardell C, Sanchez M, Garcia-Martinez A, Esteban MJ *et al.* Elevated production of interleukin-6 is associated with a lower incidence of disease-related ischemic events in patients with giant-cell arteritis: angiogenic activity of interleukin-6 as a potential protective mechanism. *Circulation* 2003;107:2428-34.
- [51] Hernandez-Rodriguez J, Segarra M, Vilardell C, Sanchez M, Garcia-Martinez A, Esteban MJ *et al.* Tissue production of pro-inflammatory cytokines (IL-1beta, TNFalpha and IL-6) correlates with the intensity of the systemic

- inflammatory response and with corticosteroid requirements in giant-cell arteritis. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43:294-301.
- [52] Roche NE, Fulbright JW, Wagner AD, Hunder GG, Goronzy JJ, Weyand CM. Correlation of interleukin-6 production and disease activity in polymyalgia rheumatica and giant-cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1993; 36:1286-94.
- [53] Nikkari ST, Hoyhtya M, Isola J, Nikkari T. Macrophages contain 92-kd gelatinase (MMP-9) at the site of degenerated internal elastic lamina in temporal arteritis. *Am J Pathol* 1996;149:1427-33.
- [54] Segarra M, Garcia-Martinez A, Sanchez M, Hernandez-Rodriguez J, Lozano E, Grau JM *et al*. Gelatinase expression and proteolytic activity in giant-cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1429-35.
- [55] Weyand CM, Wagner AD, Bjornsson J, Goronzy JJ. Correlation of the topographical arrangement and the functional pattern of tissue-infiltrating macrophages in giant-cell arteritis. *J Clin Invest* 1996;98: 1642-9.
- [56] Rodriguez-Pla A, Bosch-Gil JA, Rossello-Urgell J, Huguet-Redecilla P, Stone JH, Vilardell-Tarres M. Metalloproteinase-2 and -9 in giant-cell arteritis: involvement in vascular remodeling. *Circulation* 2005;112:264-9.
- [57] Kaiser M, Weyand CM, Bjornsson J, Goronzy JJ. Platelet-derived growth factor, intimal hyperplasia, and ischemic complications in giant-cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:623-33.
- [58] Kaiser M, Young B, Bjornsson J, Goronzy JJ, Weyand CM. Formation of new vasa vasorum in vasculitis. Production of angiogenic cytokines by multinucleated giant cells. *Am J Pathol* 1999;155:765-74.
- [59] Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002;90:251-62.
- [60] Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Llorca J, Hajeer AH, Branas F, Dababneh A *et al*. Visual manifestations of giant-cell arteritis. Trends and clinical spectrum in 161 patients. *Medicine* 2000;79:283-92.
- [61] Rauzy O, Fort M, Nourhashemi F, Alric L, Juchet H, Ecoiffier M *et al*. Relation between HLA-DRB1 alleles and corticosteroid resistance in giant-cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 1998;57:380-2.
- [62] Banks PM, Cohen MD, Ginsburg WW, Hunder GG. Immunohistologic and cytochemical studies of temporal arteritis. *Arthritis Rheum* 1983;26:1201-7.
- [63] Lavignac C, Jauberteau-Marchan MO, Liozon E, Vidal E, Catanzano G, Liozon F. Immunohistochemical study of lesions in Horton's temporal arteritis before and during corticotherapy. *Rev Med Interne* 1996;17: 814-20.
- [64] Chatelain D, Duhaut P, Schmidt J, Loire R, Bosshard S, Guernou M *et al*. Pathological features of temporal arteries in patients with giant-cell arteritis presenting with permanent visual loss. *Ann Rheum Dis* 2009;68: 84-8.
- [65] Cid MC, Cervera R, Font J, Lopez-Soto A, Pallares L, Navarro M *et al*. Late thrombotic events in patients with temporal arteritis and anticardiolipin antibodies. *Clin Exp Rheumatol* 1990;8:359-63.
- [66] Duhaut P, Berruyer M, Pinede L, Demolombe-Rague S, Loire R, Seydoux D *et al*. Anticardiolipin antibodies and giant-cell arteritis: a prospective, multicenter case-control study. Groupe de recherche sur l'arterite a cellules géantes. *Arthritis Rheum* 1998; 41:701-9.
- [67] Liozon E, Roblot P, Paire D, Loustaud V, Liozon F, Vidal E *et al*. Anticardiolipin antibody levels predict flares and relapses in patients with giant-cell (temporal) arteritis. A longitudinal study of 58 biopsy-proven cases. *Rheumatology (Oxford)* 2000; 39:1089-94.
- [68] Liozon E, Roussel V, Roblot P, Liozon F, Preud'Homme JL, Loustaud V *et al*. Absence of anti-beta2 glycoprotein I antibodies in giant-cell arteritis: a study of 45 biopsy-proven cases. *Br J Rheumatol* 1998;37:1129-31.
- [69] Manna R, Latteri M, Cristiano G, Todaro L, Scuderi F, Gasbarrini G. Anticardiolipin antibodies in giant-cell arteritis and polymyalgia rheumatica: a study of 40 cases. *Br J Rheumatol* 1998;37:208-10.
- [70] Liozon F, Jauberteau-Marchan MO, Boutros-Toni F, Barrier JH, Dupond JL, Roblot P *et al*. Anticardiolipin antibodies and Horton disease. *Ann Med Interne* 1995;146:541-7.
- [71] Navarro M, Cervera R, Font J, Reverter JC, Monteagudo J, Escobar G *et al*. Anti-endothelial cell antibodies in systemic autoimmune diseases: prevalence and clinical significance. *Lupus* 1997;6:521-6.
- [72] Servetaz A, Guilpain P, Tamas N, Kaveri SV, Camoin L, Mouthon L. Natural anti-endothelial cell antibodies. *Autoimmun Rev* 2008;7:426-30.
- [73] Domiciano DS, Carvalho JF, Shoenfeld Y. Pathogenic role of anti-endothelial cell antibodies in autoimmune rheumatic diseases. *Lupus* 2009;18:1233-8.
- [74] Regent A, Dib H, Ly KH, Agard C, Tamby MC, Tamas N *et al*. Identification of target antigens of anti-endothelial cell and anti-vascular smooth muscle cell antibodies in patients with giant-cell arteritis: a proteomic approach. *Arthritis Res Ther* 2011;13: R107.
- [75] Baerlecken NT, Linnemann A, Gross WL, Moosig F, Vazquez-Rodriguez TR, Gonzalez-Gay MA *et al*. Association of ferritin auto-antibodies with giant-cell arteritis/polymyalgia rheumatica. *Ann Rheum Dis* 2012;71: 943-7.
- [76] Mohan SV, Liao YJ, Kim JW, Goronzy JJ, Weyand CM. Giant-cell arteritis: immune and vascular aging as disease risk factors. *Arthritis Res Ther* 2011;13:231.
- [77] Czesnikiewicz-Guzik M, Lee WW, Cui D, Hiruma Y, Lamar DL, Yang ZZ *et al*. T cell subset-specific susceptibility to aging. *Clin Immunol* 2008;127:107-18.
- [78] Goronzy JJ, Fulbright JW, Crowson CS, Poland GA, O'Fallon WM, Weyand CM. Value of immunological markers in predicting responsiveness to influenza vaccination in elderly individuals. *J Virol* 2001;75:12182-7.
- [79] Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ. T-cell senescence: a culprit of immune abnormalities in chronic inflammation and persistent infection. *Trends Mol Med* 2004;10:119-24.
- [80] Weyand CM, Fujii H, Shao L, Goronzy JJ. Rejuvenating the immune system in rheumatoid arthritis. *Nature Rev Rheumatol* 2009;5:583-8.
- [81] Grolleau-Julius A, Harning EK, Abernathy LM, Yung RL. Impaired dendritic cell function in aging leads to defective antitumor immunity. *Cancer Res* 2008;68:6341-9.
- [82] Panda A, Qian F, Mohanty S, van Duin D, Newman FK, Zhang L *et al*. Age-associated decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts influenza vaccine response. *J Immunol* 2010;184: 2518-27.
- [83] Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:729-40.
- [84] Lee HY, Oh BH. Aging and arterial stiffness. *Circ J* 2010;74:2257-62.
- [85] Li M, Fukagawa NK. Age-related changes in redox signaling and VSMC function. *Antioxid Redox Signal* 2010;12:641-55.
- [86] Sawabe M. Vascular aging: from molecular mechanism to clinical significance. *Geriatr Gerontol Int* 2010;10(Suppl. 1):S213-20.
- [87] Wang M, Monticone RE, Lakatta EG. Arterial aging: a journey into subclinical arterial disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010; 19:201-7.
- [88] Goronzy JJ, Weyand CM. Cytokines in giant-cell arteritis. *Cleve Clin J Med* 2002;69(Suppl. 2):S1191-4.
- [89] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M *et al*. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235-8.
- [90] Koenen HJ, Smeets RL, Vink PM, van Rijssen E, Boots AM, Joosten I. Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* 2008;112:2340-52.
- [91] Samson M, Audia S, Janikashvili N, Ciudad M, Trad M, Fraszczak *et al*. Brief report: Inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg cell imbalance in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2012;64:2499-503.



- [92] Catanos MG, Pipitone ML, Versari N, Dardani A, Pulsatelli L, Meliconi L *et al.* A novel therapy for patients with large-vessel vasculitis. *Arthritis Rheum* 2011;63:S588.
- [93] Salvarani C, Magnani L, Catanos M, Pipitone N, Versari A, Dardani L *et al.* Tocilizumab: a novel therapy for patients with large-vessel vasculitis. *Rheumatology (Oxford)* 2012; 51:151-6.
- [94] Seitz M, Reichenbach S, Bonel HM, Adler S, Wermelinger F, Villiger PM. Rapid induction of remission in large-vessel vasculitis by IL-6 blockade. A case series. *Swiss Med Wkly* 2011;141:w13156.
- [95] Unizony SAUL, Miloslavsky E, Arvikar SL, Khosroshahi A, Stone JH. Tocilizumab for the treatment of large-vessel vasculitis (giant-cell arteritis, takayasu arteritis) and polymyalgia rheumatica: a case series. *Arthritis Rheum* 2011;63:S589.

# Pathogenesis of giant cell arteritis: new insight into the implication of CD161+ T cells

M. Samson<sup>1-3</sup>, S. Audia<sup>1-3</sup>, L. Martin<sup>2-4</sup>, N. Janikashvili<sup>2,3</sup>, B. Bonnotte<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>Service de Médecine Interne et Immunologie Clinique, CHU, Dijon, France;

<sup>2</sup>INSERM, UMR1098, Besançon, France;

<sup>3</sup>Faculté de Médecine, Université de Bourgogne, Dijon, France;

<sup>4</sup>Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU, Dijon, France.

Maxime Samson, MD

Sylvain Audia, MD, PhD

Laurent Martin, MD, PhD

Nona Janikashvili, PhD

Bernard Bonnotte, MD, PhD

Please address correspondence to:

Prof. Bernard Bonnotte,

Service de Médecine Interne et

Immunologie Clinique,

CHU Dijon le Bocage,

2 Bd Mal de Lattre de Tassigny,

21000 Dijon, France.

E-mail: [bernard.bonnotte@chu-dijon.fr](mailto:bernard.bonnotte@chu-dijon.fr)

Received on January 28, 2013; accepted in revised form on February 19, 2013.

*Clin Exp Rheumatol* 2013; 31 (Suppl. 75): S65-S73.

© Copyright CLINICAL AND

EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY 2013.

**Key words:** giant cell arteritis, T cell, Th1 cells, Th17 cells, CD161, regulatory T cells, interleukin-6

## ABSTRACT

*Giant cell arteritis (GCA) is a granulomatous large-vessel vasculitis that usually affects the aorta and/or its major branches, especially the branches of the carotid arteries. Histo-pathological lesions are observed in all layers of the artery leading to segmental and focal panarteritis with a polymorphic cell infiltrate that includes T cells, macrophages and multinucleated giant cells, a fragmented internal elastic lamina and intimal hyperplasia. The pathophysiology of GCA is complex and not fully understood. In this review, we discuss the immunological aspects of GCA pathogenesis with a particular emphasis on T cell responses. Upon dendritic cell activation in the adventitia, CD4 T cells co-expressing CD161 are recruited in the arterial wall and polarised into Th1 and Th17 cells that produce IFN- $\gamma$  and IL-17, respectively. These cytokines activate macrophages, giant cells and vascular smooth muscle cells, thus inducing vascular remodelling which leads to the ischaemic manifestations of GCA. Macrophages infiltrating the adventitia produce IL-1 $\beta$  and IL-6, which are responsible for the general symptoms encountered in GCA.*

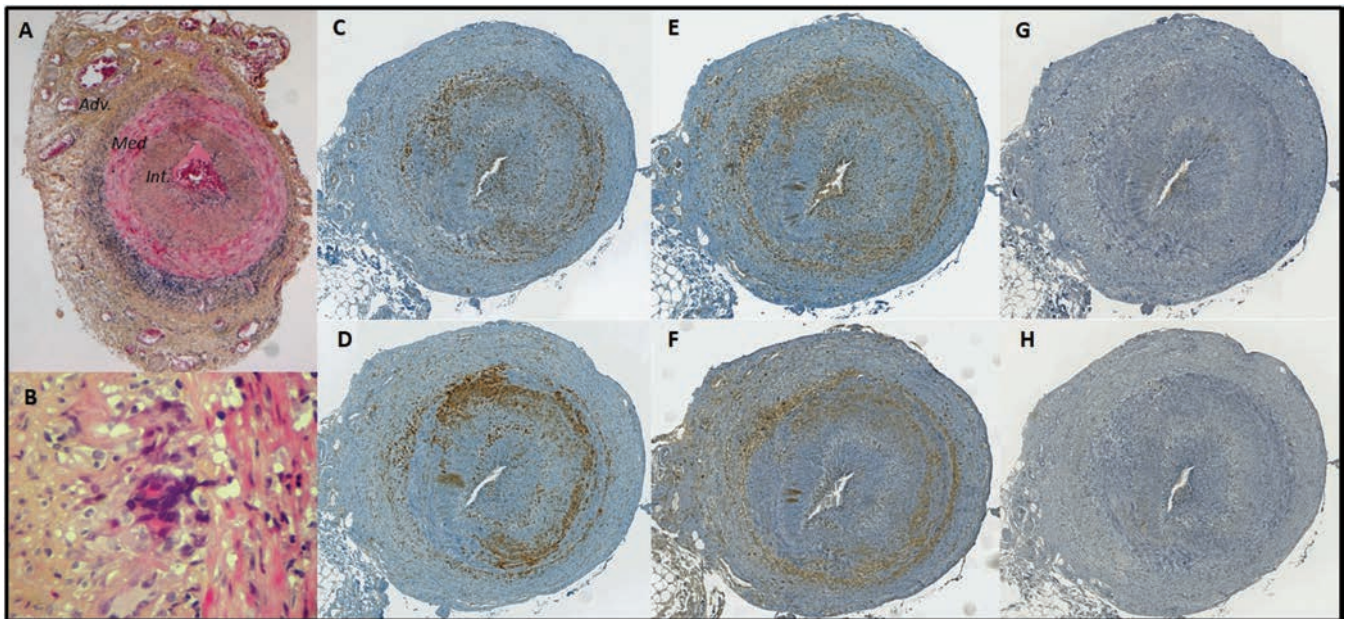
## Introduction

Giant cell arteritis (GCA) is a large-vessel vasculitis which usually affects the aorta and its major branches (1, 2). The term temporal arteritis is not a suitable alternative for GCA because temporal arteries are not always involved, and because other types of vasculitis can affect them. GCA is the most common vasculitis in adults over 50 years (3, 4). The peak incidence is observed between 70 and 80 years (3, 4). The prevalence of GCA depends on ethnic backgrounds. The disease seems to be very rare in African, Ara-

bic, Hispanic and Asian countries (5-9). The highest prevalence is observed in Scandinavian countries and in Olmsted County, Minnesota, and reaches 18.8 cases per 100,000 people (10). This North to South incidence gradient and the highest frequency of GCA in Scandinavian ethnic groups suggest that GCA has a genetic background. A number of factors have been thought to increase the risk of GCA. These include haplotypes of human leukocyte antigen (HLA) class I and II (11), particularly the HLA-DRB1\*0401, DRB1\*0404 or DRB1\*0408 haplotypes, expressed by 60% of patients affected by polymyalgia rheumatica (PMR) or GCA (12-14). Similarly to rheumatoid arthritis, a shared epitope exists in GCA: a conserved sequence of amino-acids between position 28 and 31 of the 2<sup>nd</sup> domain of the GCA associated HLA class-II  $\beta$  chain (HLA-DRB1\*0401, HLA-DRB1\*0404 and HLA-DRB1\*0408) has been described (13). Other genes have been studied and polymorphisms of tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (14), interleukin-6 (IL-6) (15), corticotropin-releasing hormone (CRH) (16), intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), NLRP1 rs8182352 polymorphism (17), regulated and normal T cell expressed and secreted (RANTES/CCL5) promoter, CCR5 or IL-1Ra (14) have been linked to an increased risk of developing GCA. Such associations underline the preponderant role of adaptive immunity in GCA pathogenesis. However, no pathognomonic genetic feature has been associated with GCA.

Some studies have also reported seasonal variations or a cyclic pattern, suggesting the involvement of a triggering environmental factor (3, 18). Several studies have investigated the potential role of viruses and/or bacteria

Competing interests: none declared.



**Fig. 1.** Temporal artery biopsy affected by GCA. May Grünwald Giemsa staining (**A, B**) showing granulomatous inflammatory infiltration, fragmentation of the media and intimal hyperplasia leading to stenosis (**A**). Cellular infiltration is composed of mononuclear cells, especially at the media-adventitia junction where multinucleated giant-cells are observed (**B**). Immunohistochemistry analyses of a TAB from a patient affected by GCA (**C, D, E, F, G, H**). Positive cells appear in brown, showing an infiltration of the arterial wall by T cells (CD3 staining, [**C**]), macrophages (CD68 staining, [**D**]), Th1 cells (IFN- $\gamma$  staining, [**E**]), Th17 cells (IL-17 staining, [**F**]). Very few Treg cells (Foxp3 staining, [**G**]) and no B cells (CD20 staining, [**H**]) are observed. Adv: adventitia, Med: media; Int: intima. Magnification x 40.

in the pathogenesis of GCA. Case-control studies have reported the detection of viral and/or bacterial DNA by PCR, immunohistochemistry or *in situ* hybridisation in temporal artery biopsies (TAB) from patients with GCA: cytomegalovirus, parvovirus B19, herpes simplex virus and *Chlamydia pneumoniae*, for example (19). However, these results have not been confirmed by larger studies. More recently, some authors reported evidence of the implication of a *Burkholderia*-like strain (*Burkholderia pseudomallei*-like): this attenuated newly-identified species of *Burkholderia* has been isolated from temporal arteries of GCA subjects, through 16S rRNA analysis followed by multilocus sequence typing. *Burkholderia* lipopolysaccharide (LPS) has also been detected in TAB and serum of GCA patients. Culture of a GCA TAB was positive for *Burkholderia pseudomallei*-like species that were injected into mice and triggered inflammation of pulmonary blood vessels (20). GCA is a focal and segmental panarteritis with non-necrotising granulomatous inflammation, affecting large vessels, especially the aorta, the external carotid and its branches such as the temporal

artery. However, all large arteries can be affected (21). GCA classical histology is characterised by a granuloma associated with infiltration by T lymphocytes (mainly CD4<sup>+</sup> T cells) and macrophages, and the presence of multinucleated giant cells, which are usually located at the intima-media junction. B cells are usually absent in TAB from GCA patients (Fig. 1). However, only about 50% of routine biopsy samples show all these typical features. In the others, only a chronic inflammatory reaction, featuring lymphomononuclear cells but no giant cells is noticed. Fibrinoid necrosis in the temporal artery layers or in the wall of vasa vasorum is not usual in GCA lesions and should rule out the diagnosis.

Arterial topography of the inflammatory process accounts for ischaemic symptoms of the disease such as headache, jaw claudication, visual loss, scalp or tongue necrosis, central nervous system ischaemic complications. Systemic symptoms (fever, asthenia, anorexia and weight loss) are the consequence of chronic inflammation. In 27 to 56% of cases, GCA is associated with PMR, which has a common pathogenesis (22). The treatment of GCA is based on glucocorticoids that are very effective but

difficult to stop. The mean duration of treatment is 18 months, which is responsible for a high level of morbidity and mortality in this elderly population (23). In this review, the pathogenesis of GCA is detailed, especially its immunopathology with emphasis on new therapeutic targets and the role of CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> T cells.

### Pathophysiological model of GCA

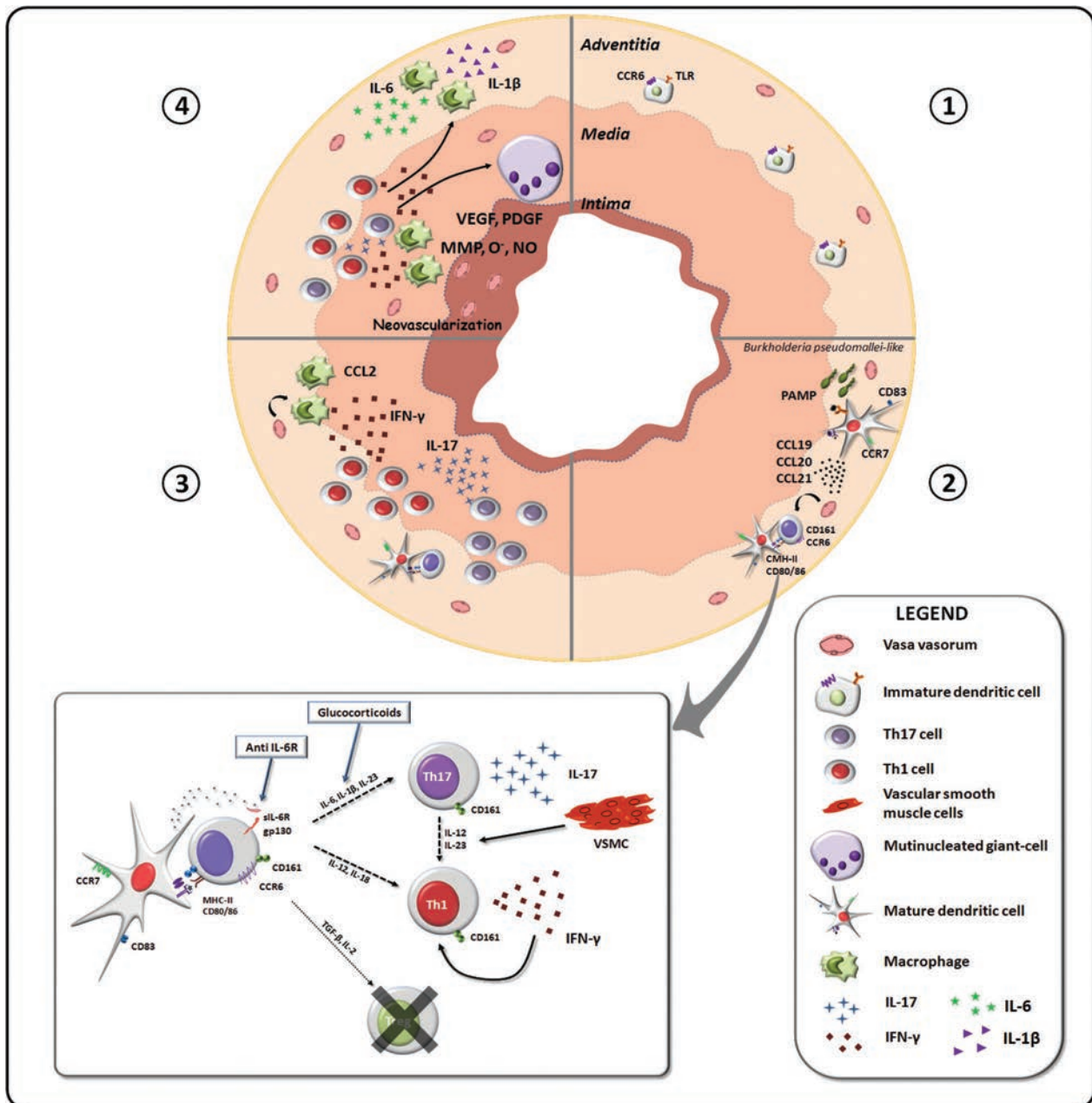
GCA affects only large arteries such as the aorta and its major branches (before visceral arteries). These arteries have a prominent internal elastic membrane and vasa vasorum. The architecture of the artery plays a major role in the pathogenesis of the disease. When cervical arteries penetrate through the dura, they become thinner, have less elastic tissue and lose their vasa vasorum. Intracranial arteries are thus very rarely affected by GCA (24).

#### 1. The three events in the pathogenesis of GCA

The pathogenesis of GCA can be divided into three phases (Fig. 2):

- Activation of vascular adventitial dendritic cells (DC) via TLR stimulation





**Fig. 2.** Pathogenesis of GCA.

**1.** In healthy artery, dendritic cells (DC) of the adventitia are immature, express CCR6 and display particular TLR profiles, depending on the type of artery.

**2.** The detection of PAMPs (*pathogen associated molecular pattern*) or other danger signals by TLR induce DC activation. *Burkholderia pseudomallei*-like LPS could trigger DC activation. Activated DC modify their morphology, express high levels of MHC class-II, costimulatory molecules such as CD80 and CD86, CCR7 and produce cytokines and chemokines such as CCL19, CCL20 and CCL21 which recruit, activate and induce CD4<sup>+</sup> T cell differentiation. Recruited T cells mainly expressing CCR6 and CD161 are polarised into Th17 cells (in the presence of IL-6, IL-1β and IL-23) and/or Th1 cells (IL-12 and IL-18). These proinflammatory cytokines do not allow Treg generation, which leads to a chronic inflammatory response. Th17 cells produce IL-17, which triggers IL-23 and IL-12 production by resident cells, thus stabilising the Th17 lineage (IL-23) and increasing Th1 polarisation (IL-12). Glucocorticoids are able to decrease the production of Th17 cytokines but have no effect on Th1 cell polarisation. Anti-IL-6R (tocilizumab) can inhibit Th17 polarisation and increase Treg generation, correcting the Th17/Treg imbalance.

**3.** The arterial wall is infiltrated by oligoclonal Th1 and Th17 cells producing IFN-γ and IL-17, respectively. Thereafter, macrophages are recruited through CCL2 production. They are activated by cytokines secreted by T cells, especially IFN-γ.

**4.** Macrophages of the adventitia produce large amounts of IL-1β and IL-6 which are responsible for the general symptoms of GCA. IL-1β and IL-6 also initiate positive feedbacks that amplify local inflammation. In the media, macrophages produce growth factors: VEGF triggers neovascularisation, which increases immune-cell homing, while PDGF induces the migration and proliferation of vascular smooth muscle cells thus generating intimal hyperplasia. IFN-γ-activated macrophages also synthesise reactive oxygen species (O<sup>•</sup>), nitric oxide (NO) and matrix metalloproteinases (MMP), which induce media destruction and internal elastic lamina digestion. Vascular remodelling is responsible for the ischaemic manifestations of GCA.

DC: dendritic cell; CCL: chemokines; CCR: chemokine receptor (CC family); CD: cluster of differentiation; MHC-II: major histocompatibility complex; IFN-γ: interferon-gamma; IL: interleukin; MMP: metalloproteinase; O<sup>•</sup>: reactive oxygen species; PAMP: pathogen associated molecular pattern; PDGF: platelet-derived growth factor; TLR: toll like receptor; VEGF: vascular endothelial growth factor.

- Recruitment and activation of CD4<sup>+</sup> T cells
- Recruitment of macrophages (MP) and vascular remodelling

*a. Activation of vascular adventitial dendritic cells (DC) via TLR stimulation*

Immature myeloid DC, defined by a S100<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CD83<sup>+</sup>MHC-II<sup>low</sup> phenotype are physiologically localised in the adventitia of arteries (25-28) and involved in immune surveillance. These cells play the role of immune sentinels and therefore, through the expression of toll-like receptor (TLR), have the ability to either sense danger signals and trigger adaptive immunity or to regulate localised and possibly systemic inflammatory responses in the absence of a danger signal (29). The detection of a danger signal via the TLR of adventitial DC induces their activation, followed by the phenotypic modifications (S100<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD83<sup>+</sup>CD80/86<sup>+</sup>MHC-II<sup>high</sup>) and the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines responsible for the homing of CD4<sup>+</sup> T cells. Upon activated, DC express high levels of MHC class-II and co-stimulatory molecules responsible for T lymphocyte stimulation and their recruitment in the wall of the artery. In TAB from patients affected by PMR only, DC are activated but their presence is restricted only within the adventitia, whereas they infiltrate all the layers of the artery in GCA TAB, highlighting the pathological continuum between PMR and GCA (27, 28).

Using a humanised model of GCA, in which human temporal arteries are grafted into SCID mice, Weyand's team showed that the depletion of activated DC through an anti-CD83 antibody was able to reduce vasculitis, T cell infiltration and IFN- $\gamma$  production, thus demonstrating the major role of adventitial DC in the pathogenesis of GCA (28). The danger signal in GCA has still not been identified but some data suggest on an infectious trigger recognised via TLR (3, 18, 19, 30). In healthy temporal arteries grafted into SCID mice, the injection of TLR ligands such as Freund complete adjuvant (TLR2 ligand) or LPS (TLR4 ligand) induced

DC activation followed by vasculitis due to the activation of autologous T cells injected thereafter and recruited in the arterial wall (28). Among the different danger signals tested, LPS triggered the strongest activation of DC: CD83 expression, chemokine (CCL18, CCL19, CCL20) and cytokine (IL-18) production (28). The various locations of the artery lesions in GCA may be explained by the different profiles of TLR expression by adventitial DC. This hypothesis was confirmed by post-mortem TLR gene expression studies in large arteries from 37 patients (31). TLR were expressed almost exclusively by myeloid DC located at the adventitia-media junction. In all the arteries, most of the TLR (TLR1 to 9) were expressed: TLR2 and 4 ubiquitously, TLR7 and 9 infrequently, and TLR1, 3, 5, 6 and 8 were selectively expressed in some patterns, so that each vessel exhibited a distinct TLR profile. Notably, the temporal artery profile was different from that of other vessels: TLR2, 4 and 8 were highly expressed, whereas TLR1, 5 and 6 expression was low. The TLR expression profile in the aorta and carotid arteries was the most comparable to that in the temporal artery. These data can explain the tropism of GCA for the external carotid and its branches (31).

Unlike the classical immune response, activated DC do not migrate into lymph nodes in GCA. They produce CCL19 and CCL21 as well as their receptor (CCR7), and are thus trapped in the wall of the artery (27).

*b. Recruitment, activation and polarisation of CD4<sup>+</sup> T cells*

CD4<sup>+</sup> T cell depletion in the model of SCID mice engrafted with arteries from GCA patients led to a significant decrease in vasculitis lesions, while when there is no depletion the inflammatory process persists (32). These results highlight the essential role of CD4<sup>+</sup> T cells in the pathogenesis of GCA. Studies focusing on T-cell receptor (TCR) V genes in the arterial wall of GCA patients have shown a restricted oligoclonal repertoire, which strengthens the hypothesis of local proliferation and activation of CD4<sup>+</sup> T cells by mature

DC (33-35). Furthermore, analyses of CD4<sup>+</sup> T cells recovered from right and left temporal arteries of the same GCA patient revealed identical TCR profiles, thus providing strong evidence of an antigen-driven immune response in GCA (35).

Notably, CD4<sup>+</sup> T cells are absent from the wall of healthy arteries; they are recruited after DC activation and maturation in response to the production of different chemokines: CCL18, CCL19, CCL20 and CCL21 (19, 26). CD4<sup>+</sup> T cells first infiltrate the adventitia through vasa vasorum, whose endothelial cells highly express adhesion molecules like intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) (19, 26). It has been shown that the type of danger signal that activates adventitial DC determines the type of chemokines produced and consequently the subsets of CD4<sup>+</sup> T cells infiltrating the arterial wall. Activation of TLR4 by LPS triggers production of CCL20 leading to the recruitment of activated CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells that proliferate and trigger panarteritis (36). Interestingly, CCR6 is particularly expressed by Th17 cells, whereas Th1 cells do not express CCR6 but strongly upregulate CXCR3, the receptor for CXCL9, CXCL10 and CXCL11 (37). When DC are activated by a TLR5 ligand, only CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells are recruited in the arterial wall. These T cells are unable to infiltrate all the layers of the artery, thus triggering periarteritis that is different from GCA lesions (36).

Once recruited in the arterial wall, CD4<sup>+</sup> T cells are activated by DC that present a still unidentified antigen. The high concentrations of proinflammatory cytokines such as IL-12, IL-18, IL-23, IL-6 and IL-1 $\beta$  in the microenvironment, lead to Th1 and Th17 commitment of CD4<sup>+</sup> T cells. Th1 cells, generated in the presence of IL-12 and IL-18, produce IFN- $\gamma$ , whereas Th17 cells, generated in the presence of IL-6, IL-1 $\beta$  and IL-23, produce IL-17. IL-17 is a potent proinflammatory cytokine that has recently been implicated in several autoimmune and autoinflammatory diseases such as multiple sclerosis, Crohn's disease or rheumatoid

arthritis (38, 39). The percentage of circulating Th17 cells in the blood of patients affected by GCA is increased in comparison with healthy controls (40–42). The arterial wall is also strongly infiltrated by Th1 and Th17 cells (figure 1). The response to glucocorticoids for these two populations of T cells seems to be different: after treatment Th17 decreased in both the blood and the arteries, whereas Th1 cells resist to glucocorticoids (40), even though data are sometimes contradictory (41). Indeed, corticosteroids trigger a decrease in Th17 cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-23) but do not modify the production of Th1 cytokines (IL-12) by monocytes isolated from the blood or from TAB of GCA patients (40). IL-17 expression in TAB, measured by RT-PCR, has recently been shown to be a predictor of response to glucocorticoid treatment in GCA (43). These results may suggest the involvement of two distinct pathways in GCA pathogenesis (44). In the first pathway, DC produce IL-6, IL-23 and IL-1 $\beta$  triggering Th17 polarisation and IL-17 secretion, which activates endothelial cells, vascular smooth muscle cells (VSMC) and fibroblasts. This pathway is inhibited by glucocorticoids. In the second pathway, DC producing IL-12 and IL-18 lead to the generation of Th1 cells which secrete IFN- $\gamma$  and activate macrophages, endothelial cells and cytotoxic cells. This pathway, which could be independent of the first one, is resistant to glucocorticoids and responsible for the chronic manifestations of GCA (40, 44). This hypothesis is probably not totally true since it is now admitted that polarised T cells, such as Th1, Th17 and regulatory T cells (Treg) are not stable. In fact, due to their plasticity, Th1, Th17 and Treg cells can differentiate into each other, depending on the cytokines produced in their environment (45–47). Rather than two independent pathways with two different types of DC and T cells, it is more likely that only one subset of DC triggers Th1 and Th17 polarisation from a common CD4<sup>+</sup> T cell precursor. Thereafter, under glucocorticoid therapy, Th17 cells decrease whereas Th1 lymphocytes are maintained due to the persistence of IL-12 producing

DC (45). In a recent study using an IL-17-dependent colitis murine model, Th17 cells were able to induce IL-12 production by resident cells leading to the generation of Th1 cells producing IFN- $\gamma$  (48). These results suggest that Th17 cells are able to induce their own polarisation into Th1 cells. Therefore, we cannot exclude the possibility that the extinction of Th17 cells and the persistence of Th1 cells might be the natural history of GCA.

Some results recently published by our team argue in favour of the former hypothesis. We have shown that CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> T cells, considered as precursors of Th17 cells in humans (49), were functionally modified in GCA. These CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> cells isolated from the blood of GCA patients produced higher levels of IL-17 than those from healthy controls (41). Furthermore, whereas they represent about 10 to 20% of circulating CD4<sup>+</sup> T cells, the great majority of T cells infiltrating the wall of the artery of GCA patients expressed CD161. Of note, CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> T cell recruitment in the artery is fostered by the expression of CCR6, more than 90% of these cells expressing CCR6 (41, 49). CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> T cells infiltrate all the layers of the artery during GCA and produce both IL-17 and IFN- $\gamma$  (41).

However, these precursor cells need to be further characterised as different immune cells also express CD161. Actually, CD161 is the human homologue of the mouse NK1.1, expressed on NK cells and also some subsets of T cells defined as NKT cells (50, 51). In humans, NKT cells (type I) are  $\alpha$ -galactosylceramide reactive and CD1d restricted, using invariant TCR  $\alpha$  chain consisting of V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 with V $\beta$ 11 (50, 51). The percentage of NKT cells among human circulating CD4<sup>+</sup> T cells is <1% (50, 51). Other human cell populations also express CD161 but are restricted to conventional MHC molecules, exhibit a polyclonal TCR repertoire and have been named NKT-like CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells (50, 51). These CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> T cells represent about 10 to 20% of circulating CD4<sup>+</sup> T cells, express CCR6 and are characterised by a T-cell memory phenotype (CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) (30, 50, 51). It is now clear

that human Th17 cells differentiate from CD161<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells that are not CD1d restricted but dependent on MHC class II with a variant repertoire (49). CD161 is thus considered a specific marker of the Th17 lineage. Therefore, expression of CD161 by IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T cells (Th1 cells) strongly supports the hypothesis that these Th1 lymphocytes are double positive (IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) or were polarised into Th1 from a Th17 state (41), due to the plasticity of T cell lineages (45, 46), as recently demonstrated in juvenile arthritis (52).

Regulatory T cells (Treg), defined by a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> phenotype are immunosuppressive cells that may also play a role in GCA pathogenesis (53). Actually, Treg are very rare in the arterial wall of arteries from GCA patients (figure 1) and the percentage of Treg in the peripheral blood of GCA patients is lower than that in healthy controls (41). However, their suppressive activity is not altered (41). This deficiency in the circulating Treg immune response in GCA is unable to control the strong Th1 and Th17 immune responses and thus, is probably involved in the sustained inflammation observed in GCA. Other types of immune dysregulation may also explain immune activation in the pathogenesis of GCA. It has recently been reported that the physiological expression of PD-L1 by endothelial cells of the vasa vasorum, which allows the inhibition of activated or cytotoxic T cells and have also been shown to trigger Treg generation (54), was strongly decreased, thus leading to a loss of the immune privilege that characterises the arterial wall. This hypothesis was confirmed by an accelerated vessel-wall inflammation (55) in human artery-SCID chimeras treated with a blocking PD-L1 fusion protein.

### c. Vascular remodelling

Two different clinical signs of GCA are associated with two different processes: the inflammatory syndrome with systemic production of IL-6 and IL-1 $\beta$  is responsible for general symptoms, whereas vascular remodelling triggers ischaemic manifestations (56).

Infiltration of the arterial wall by T lymphocytes and their polarisation into



Th1 and Th17 cells leads to the secretion of high levels of IL-17 and IFN- $\gamma$ . The exact role of IL-17 in vascular remodelling is still not completely defined (38). IFN- $\gamma$  activates macrophages that are recruited in the arterial wall through CCL2 production (57, 58). Macrophage activation will lead to the genesis of giant cells that are one of the pathological GCA hallmark. CCL2 is produced by leukocytes in the arterial wall, but also by VSMC of the media (57). The involvement of CCL2 in the pathogenesis of GCA is supported by the positive correlation between the risk of relapse in the first year and the level of expression of CCL2 in the arterial wall (57). IFN- $\gamma$ -stimulated macrophages of the adventitia produce IL-1 $\beta$  and IL-6 which amplify the local inflammatory response and are responsible for the general signs encountered in GCA: weakness, fever, weight loss, anorexia and acute phase response (19, 26, 30, 59-61). Upon activation by IFN- $\gamma$ , macrophages in the media produce reactive oxygen species causing lipid peroxidation of phospholipids. Nitric oxide (NO) is produced by the induced NO-synthase and triggers nitration of endothelial proteins. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), produced by VSMC and macrophages, is especially detected in granulomatous areas in arteries affected by GCA and is capable of destroying cellular matrix proteins including elastin and causing destruction of the media and digestion of the internal elastic lamina (19, 56). Macrophages activated by IFN- $\gamma$  and giant cells produce also growth factors: platelet-derived growth factor (PDGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) (62). PDGF triggers activation and proliferation of VSMC leading to vascular hyperplasia. VEGF is responsible for neoangiogenesis, which increases the recruitment of other immune cells (63).

VSMC of the media are major components of the arterial wall. They have contractile functions and are involved in the healing and repair of wall damage due to their ability to migrate, proliferate and produce matrix (36). During GCA, T cells and macrophages infiltrate the media so that VSMC are

the direct target of their toxic mediators. VSMC are not only targets of the inflammatory process but are also implicated in its generation since they are able to migrate and proliferate in the intima and to produce MMP-2 and MMP-9 (36, 64). Neoangiogenesis and intimal hyperplasia are directly responsible for the ischaemic symptoms of GCA (63). Vasa vasorum are normally restricted to the adventitia. In GCA, they are also present in the media and the intima, which correlates with internal elastic lamina digestion and infiltration by giant cells.

Endothelial cells are the natural barrier between blood and tissues. They are involved in the regulation of vasomotion, hemostasis, angiogenesis and inflammation. Activated by the cytokines produced by macrophages and T cells, endothelial cells of the vasa vasorum and neovessels from TAB of patients affected by GCA express high levels of adhesion molecules such as ICAM-1, ICAM-2, P-selectin, E-selectin and VCAM-1 that are involved in the recruitment of immune cells (65).

## 2. Activation of the humoral immune response

The humoral immune response seems to be less involved in GCA pathogenesis than does the cellular immune response. A few B cells are sometimes detected in TAB of GCA patients, particularly in the adventitia (Fig. 1H) (41, 66, 67) where they are associated with plasma cells, especially in patients suffering from visual loss (68). Autoantibodies may be detected during GCA but their pathogenicity is not demonstrated. Anticardiolipin (aCL) antibodies are detected in 20% to 50% of GCA patients, but at a low level, without anti- $\beta$ 2glycoprotein I antibodies and without any correlation with an increase in the risk of ischaemic events (69-73). Anti-endothelial cell antibodies (AECA) have been detected in 33% of GCA patients (74). AECA are not specific to GCA, since they are also detected in healthy controls (75) and in other autoimmune diseases (76). However, it has been shown that AECA from GCA patients targeted specific antigens expressed by endothelial cells

and VSMC, such as vinculine, lamin A/C, annexin V, voltage dependent anion-selective channel protein 2 (VDCA-2) and other proteins implicated in cellular energy metabolism (77). More recently, auto-antibodies directed against the heavy chain of human ferritin have been detected in 92% of GCA patients or PMR before treatment, but also in 29% of patients suffering from lupus and in only 1% of healthy donors (78).

## 3. Aging in GCA pathogenesis

Age is an essential factor in the onset of GCA. The aging process is associated with modifications of the immune response and vascular remodelling (79). Multiple types of cells are affected by aging: DC, T cells, endothelial cells and VSMC (79). Immune aging triggers a decrease in the number of naive T cells, an increase in memory and effector T cells, a decrease in the diversity of the T cell repertoire and an enrichment in CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> and CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> senescent T cells (80-83). DC are also affected by aging: TLR expression is maintained but DC activation and migration are impaired (84, 85). Elderly people are further exposed to infections, and latent viral or bacterial infections can be reactivated. Immune aging also alters the regulation of immune cells that can spontaneously produce cytokines: senescent DC, macrophages, endothelial cells and fibroblasts produce high levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  (79, 86). This process might generate a chronic proinflammatory state leading to the development of auto-immune diseases and atherosclerosis. Aging also modifies arterial tissues: medial degeneration, calcium deposition, increased stiffness, wall thickening, elastic fiber fractures and biochemical modifications of matrix proteins (87-90). Combined with this proinflammatory state, these modifications could trigger immunisation against arterial auto-antigens and lead to GCA (79).

## 4. IL-6: a key cytokine and a promising therapeutic target in GCA

IL-6 has been shown to be highly implicated in GCA pathogenesis. Its concentration is increased in the serum of untreated GCA patients, is decreased

by glucocorticoid treatment and correlates with disease activity, erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein level (61). IL-6 is involved in the regulation of the Th17/Treg immune balance by triggering Th17 polarisation instead of Treg generation in the presence of TGF- $\beta$  (91, 92). In GCA, the excess of IL-6 modifies the Th17/Treg immune balance in favour of Th17 cells (40-42). Glucocorticoids, the gold standard therapy for GCA, are able to decrease IL-6 concentration and impair Th17 polarisation (40, 41) but do not restore a normal Treg immune response, which might play a role in the occurrence of corticoid dependence or relapses when glucocorticoids are tapered. In rheumatoid arthritis, inhibition of the IL-6 pathway by tocilizumab, a humanised monoclonal antibody directed against IL-6 receptor (IL-6R), can correct the imbalance between Th17 and Treg cells by decreasing the percentage of Th17 cells and increasing the percentage of Treg (93). IL-6 pathway inhibition seems to be a promising therapeutic target in GCA. Several patients affected by GCA have already been treated with tocilizumab, either at diagnosis or in cases of refractory disease. A remission was rapidly obtained in almost all cases and no severe adverse events were observed after a relatively short follow-up period (5.1 to 8.3 months) (94-97).

## Conclusion

The cause of GCA remains unknown but mechanisms involved in the disease are now better characterised. Particularly, IL-6, which is involved in the control of the Th17/Treg immune balance, has a critical role in the pathogenesis of GCA, thus allowing the development of new therapeutic targets in order to decrease the dose and the duration of steroid treatment.

## References

- JENNETTE JC, FALK RJ, ANDRASSY K *et al.*: Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 187-92.
- JENNETTE JC, FALK RJ, BACON PA *et al.*: 2012 revised international chapel hill consensus conference nomenclature of vasculitides. *Arthritis Rheum* 2013; 65: 1-11.
- SALVARANI C, CANTINI F, HUNDER GG: Polymyalgia rheumatica and giant-cell arteritis. *Lancet* 2008; 372: 234-45.
- SALVARANI C, MACCHIONI P, ZIZZI F *et al.*: Epidemiologic and immunogenetic aspects of polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis in northern Italy. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 351-6.
- CHAUDHRY IA, SHAMSI FA, ELZARIDI E, ARAT YO, BOSLEY TM, RILEY FC: Epidemiology of giant-cell arteritis in an Arab population: a 22-year study. *Br J Ophthalmol* 2007; 91: 715-8.
- LEE JL, NAGUWA SM, CHEEMA GS, GERSHWIN ME: The geo-epidemiology of temporal (giant cell) arteritis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008; 35: 88-95.
- LUGO JZ, DEITCH JS, YU A *et al.*: Demographic and laboratory data may predict positive temporal artery biopsy. *J Surg Res* 2011; 170: 332-5.
- PEREIRA LS, YOON MK, HWANG TN *et al.*: Giant cell arteritis in Asians: a comparative study. *Br J Ophthalmol* 2011; 95: 214-6.
- SHAH A, JAIN S: Epidemiology of giant cell arteritis in an Arab population: a 22-year study. Ethnic variation in incidence of giant cell arteritis. *Br J Ophthalmol* 2008; 92: 724-5.
- SALVARANI C, CROWSON CS, O'FALLON WM, HUNDER GG, GABRIEL SE: Reappraisal of the epidemiology of giant cell arteritis in Olmsted County, Minnesota, over a fifty-year period. *Arthritis Rheum* 2004; 51: 264-8.
- FLORES-DOMINGUEZ C, HERNANDEZ-PACHECO G, ZUNIGA J *et al.*: [Alleles of the major histocompatibility system associated with susceptibility to the development of Takayasu's arteritis]. *Gac Med Mex* 2002; 138: 177-83.
- COMBE B, SANY J, LE QUELLEC A, CLOT J, ELIAOU JF: Distribution of HLA-DRB1 alleles of patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis in a Mediterranean population. *J Rheumatol* 1998; 25: 94-8.
- WEYAND CM, HICOK KC, HUNDER GG, GORONZY JJ: The HLA-DRB1 locus as a genetic component in giant cell arteritis. Mapping of a disease-linked sequence motif to the antigen binding site of the HLA-DR molecule. *J Clin Invest* 1992; 90: 2355-61.
- GONZALEZ-GAY MA: Genetic epidemiology. Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Arthritis Res* 2001; 3: 154-7.
- GONZALEZ-GAY MA, HAJEER AH, DABABNEH A *et al.*: IL-6 promoter polymorphism at position -174 modulates the phenotypic expression of polymyalgia rheumatica in biopsy-proven giant cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20: 179-84.
- GONZALEZ-GAY MA, HAJEER AH, DABABNEH A *et al.*: Corticotropin releasing hormone promoter polymorphisms in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20: 133-8.
- SERRANO A, CARMONA FD, CASTANEDA S *et al.*: Evidence of association of the NLRP1 gene with giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2012.
- DUHAUT P, BOSSHARD S, DUCROIX JP: Is giant cell arteritis an infectious disease? Biological and epidemiological evidence. *Presse Med* 2004; 33: 1403-8.
- LY KH, REGENT A, TAMBY MC, MOUTHON L: Pathogenesis of giant cell arteritis: More than just an inflammatory condition? *Autoimmun Rev* 2010; 9: 635-45.
- KOENING CL, KATZ BJ, HERNANDEZ-RODRIGUEZ J *et al.*: Identification of a Burkholderia-Like Strain From Temporal Arteries of Subjects with Giant Cell Arteritis. *Arthritis Rheum* 2012; 64: S373.
- AGARD C, BARRIER JH, DUPAS B *et al.*: Aortic involvement in recent-onset giant cell (temporal) arteritis: a case-control prospective study using helical aortic computed tomodensitometric scan. *Arthritis Rheum* 2008; 59: 670-6.
- BORCHERS AT, GERSHWIN ME: Giant cell arteritis: A review of classification, pathophysiology, geoepidemiology and treatment. *Autoimmun Rev* 2012; 11: A544-54.
- PROVENA, GABRIEL SE, ORCES C, O'FALLON WM, HUNDER GG: Glucocorticoid therapy in giant cell arteritis: duration and adverse outcomes. *Arthritis Rheum* 2003; 49: 703-8.
- SALVARANI C, GIANNINI C, MILLER DV, HUNDER G: Giant cell arteritis: Involvement of intracranial arteries. *Arthritis Rheum* 2006; 55: 985-9.
- BANCHEREAU J, BRIERE F, CAUX C *et al.*: Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.
- WEYAND CM, GORONZY JJ: Medium- and large-vessel vasculitis. *N Engl J Med* 2003; 349: 160-9.
- KRUPA WM, DEWAN M, JEON MS *et al.*: Trapping of misdirected dendritic cells in the granulomatous lesions of giant cell arteritis. *Am J Pathol* 2002; 161: 1815-23.
- MA-KRUPA W, JEON MS, SPOERL S, TEDDER TF, GORONZY JJ, WEYAND CM: Activation of arterial wall dendritic cells and breakdown of self-tolerance in giant cell arteritis. *J Exp Med* 2004; 199: 173-83.
- MA-KRUPA W, KWAN M, GORONZY JJ, WEYAND CM: Toll-like receptors in giant cell arteritis. *Clin Immunol* 2005; 115: 38-46.
- TALARICO R, BALDINI C, DELLA ROSSA A *et al.*: Large- and small-vessel vasculitis: a critical digest of the 2010-2011 literature. *Clin Exp Rheumatol* 2012; 30: S130-8.
- PRYSHCHEP O, MA-KRUPA W, YOUNGE BR, GORONZY JJ, WEYAND CM: Vessel-specific Toll-like receptor profiles in human medium and large arteries. *Circulation* 2008; 118: 1276-84.
- BRACK A, GEISLER A, MARTINEZ-TABOADA VM, YOUNGE BR, GORONZY JJ, WEYAND CM: Giant cell vasculitis is a T cell-dependent disease. *Mol Med* 1997; 3: 530-43.
- MARTINEZ-TABOADA V, HUNDER NN, HUNDER GG, WEYAND CM, GORONZY JJ: Recognition of tissue residing antigen by T cells in vasculitic lesions of giant cell arteritis. *J Mol Med (Berl)* 1996; 74: 695-703.
- MARTINEZ-TABOADA VM, GORONZY JJ, WEYAND CM: Clonally expanded CD8 T cells in patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 79: 263-70.
- WEYAND CM, SCHONBERGER J, OPPITZ U, HUNDER NN, HICOK KC, GORONZY JJ: Distinct vascular lesions in giant cell arteritis share identical T cell clonotypes. *J Exp Med* 1994; 179: 951-60.



36. PIGGOTT K, BIOUSSE V, NEWMAN NJ, GORONZY JJ, WEYAND CM: Vascular damage in giant cell arteritis. *Autoimmunity* 2009; 42: 596-604.
37. ANNUNZIATO F, COSMI L, LIOTTA F, MAGGI E, ROMAGNANI S: The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int Immunol* 2008; 20: 1361-8.
38. MIOSEC P, KORN T, KUCHROO VK: Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009; 361: 888-98.
39. SAMSON M, LAKOMY D, AUDIA S, BONNOTTE B: [T(H)17 lymphocytes: Induction, phenotype, functions, and implications in human disease and therapeutic.]. *Rev Med Interne* 2011; 32: 292-301.
40. DENG J, YOUNGE BR, OLSHEN RA, GORONZY JJ, WEYAND CM: Th17 and Th1 T-cell responses in giant cell arteritis. *Circulation* 2010; 121: 906-15.
41. SAMSON M, AUDIA S, FRASZCZAK J et al.: Th1 and Th17 lymphocytes expressing CD161 are implicated in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica pathogenesis. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 3788-98.
42. TERRIER B, GERI G, CHAARA W et al.: Interleukin-21 modulates Th1 and Th17 responses in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 2001-11.
43. ESPIGOL-FRIGOLE G, CORBERA-BELLALTA M, PLANAS-RIGOL E et al.: Increased IL-17A expression in temporal artery lesions is a predictor of sustained response to glucocorticoid treatment in patients with giant-cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2012 Sep 19 [Epub].
44. WEYAND CM, YOUNGE BR, GORONZY JJ: IFN-gamma and IL-17: the two faces of T-cell pathology in giant cell arteritis. *Curr Opin Rheumatol* 2011; 23: 43-9.
45. ANNUNZIATO F, ROMAGNANI S: Heterogeneity of human effector CD4<sup>+</sup> T cells. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 257.
46. PECK A, MELLINS ED: Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology* 2010; 129: 147-53.
47. ZHU J, PAUL WE: Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* 2010; 20: 4-12.
48. FENG T, QIN H, WANG L, BENVENISTE EN, ELSON CO, CONG Y: Th17 cells induce colitis and promote Th1 cell responses through IL-17 induction of innate IL-12 and IL-23 production. *J Immunol* 2011; 186: 6313-8.
49. COSMI L, DE PALMA R, SANTARLASCI V et al.: Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cell precursor. *J Exp Med* 2008; 205: 1903-16.
50. BENDELAC A, SAVAGE PB, TEYTON L: The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 297-336.
51. GODFREY DI, BERZINS SP: Control points in NKT-cell development. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 505-18.
52. COSMI L, CIMAZ R, MAGGI L et al.: Evidence of the transient nature of the Th17 phenotype of CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> T cells in the synovial fluid of patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 2504-15.
53. TANG Q, BLUESTONE JA: The Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 2008; 9: 239-44.
54. GE W, MA X, LI X et al.: B7-H1 up-regulation on dendritic-like leukemia cells suppresses T cell immune function through modulation of IL-10/IL-12 production and generation of Treg cells. *Leuk Res* 2009; 33: 948-57.
55. NASRALLAH M, VAGLIO A, MOHAN S et al.: Impairment of the inhibitory PD-1-PD-L1 axis in giant cell arteritis (GCA). *Arthritis Rheum* 2012; 64: S374.
56. WEYAND CM, GORONZY JJ: Giant-cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Ann Intern Med* 2003; 139: 505-15.
57. CID MC, HOFFMAN MP, HERNANDEZ-RODRIGUEZ J et al.: Association between increased CCL2 (MCP-1) expression in lesions and persistence of disease activity in giant-cell arteritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45: 1356-63.
58. ROLLINS BJ: Chemokines. *Blood* 1997; 90: 909-28.
59. HERNANDEZ-RODRIGUEZ J, SEGARRA M, VILARDELL C et al.: Elevated production of interleukin-6 is associated with a lower incidence of disease-related ischemic events in patients with giant-cell arteritis: angiogenic activity of interleukin-6 as a potential protective mechanism. *Circulation* 2003; 107: 2428-34.
60. HERNANDEZ-RODRIGUEZ J, SEGARRA M, VILARDELL C et al.: Tissue production of pro-inflammatory cytokines (IL-1beta, TNF-alpha and IL-6) correlates with the intensity of the systemic inflammatory response and with corticosteroid requirements in giant-cell arteritis. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43: 294-301.
61. ROCHE NE, FULBRIGHT JW, WAGNER AD, HUNTER GG, GORONZY JJ, WEYAND CM: Correlation of interleukin-6 production and disease activity in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1286-94.
62. KAISER M, WEYAND CM, BJORNSSON J, GORONZY JJ: Platelet-derived growth factor, intimal hyperplasia, and ischemic complications in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 623-33.
63. KAISER M, YOUNGE B, BJORNSSON J, GORONZY JJ, WEYAND CM: Formation of new vasa vasorum in vasculitis. Production of angiogenic cytokines by multinucleated giant cells. *Am J Pathol* 1999; 155: 765-74.
64. GALIS ZS, KHATRI JJ: Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002; 90: 251-62.
65. GONZALEZ-GAY MA, GARCIA-PORRUA C, LLORCA J et al.: Visual manifestations of giant cell arteritis. Trends and clinical spectrum in 161 patients. *Medicine (Baltimore)* 2000; 79: 283-92.
66. BANKS PM, COHEN MD, GINSBURG WW, HUNTER GG: Immunohistologic and cytochemical studies of temporal arteritis. *Arthritis Rheum* 1983; 26: 1201-7.
67. LAVIGNAC C, JAUBERTEAU-MARCHAN MO, LIOZON E, VIDALE, CATANZANO G, LIOZON F: [Immunohistochemical study of lesions in Horton's temporal arteritis before and during corticotherapy]. *Rev Med Interne* 1996; 17: 814-20.
68. CHATELAIN D, DUHAUT P, SCHMIDT J et al.: Pathological features of temporal arteries in patients with giant cell arteritis presenting with permanent visual loss. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 84-8.
69. CID MC, CERVERA R, FONT J et al.: Late thrombotic events in patients with temporal arteritis and anticardiolipin antibodies. *Clin Exp Rheumatol* 1990; 8: 359-63.
70. DUHAUT P, BERRUYER M, PINEDE L et al.: Anticardiolipin antibodies and giant cell arteritis: a prospective, multicenter case-control study. Groupe de Recherche sur l'Arterite a Cellules Geantes. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 701-9.
71. LIOZON E, ROBLLOT P, PAIRE D et al.: Anticardiolipin antibody levels predict flares and relapses in patients with giant-cell (temporal) arteritis. A longitudinal study of 58 biopsy-proven cases. *Rheumatology (Oxford)* 2000; 39: 1089-94.
72. LIOZON E, ROUSSEL V, ROBLLOT P et al.: Absence of anti-beta2 glycoprotein I antibodies in giant cell arteritis: a study of 45 biopsy-proven cases. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 1129-31.
73. MANNA R, LATTERI M, CRISTIANO G, TODARO L, SCUDERI F, GASBARRINI G: Anticardiolipin antibodies in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: a study of 40 cases. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 208-10.
74. NAVARRO M, CERVERA R, FONT J et al.: Anti-endothelial cell antibodies in systemic autoimmune diseases: prevalence and clinical significance. *Lupus* 1997; 6: 521-6.
75. SERVETTAZ A, GUILPAIN P, TAMAS N, KAVERI SV, CAMOIN L, MOUTHON L: Natural anti-endothelial cell antibodies. *Autoimmun Rev* 2008; 7: 426-30.
76. DOMICIANO DS, CARVALHO JF, SHOENFELD Y: Pathogenic role of anti-endothelial cell antibodies in autoimmune rheumatic diseases. *Lupus* 2009; 18: 1233-8.
77. REGENT A, DIB H, LY KH et al.: Identification of target antigens of anti-endothelial cell and anti-vascular smooth muscle cell antibodies in patients with giant cell arteritis: a proteomic approach. *Arthritis Res Ther* 2011; 13: R107.
78. BAERLECKEN NT, LINNEMANN A, GROSS WL et al.: Association of ferritin autoantibodies with giant cell arteritis/polymyalgia rheumatica. *Ann Rheum Dis* 2012; 71: 943-7.
79. MOHAN SV, LIAO YJ, KIM JW, GORONZY JJ, WEYAND CM: Giant cell arteritis: immune and vascular aging as disease risk factors. *Arthritis Res Ther* 2011; 13: 231.
80. CZESNIKIEWICZ-GUZIK M, LEE WW, CUI D et al.: T cell subset-specific susceptibility to aging. *Clin Immunol* 2008; 127: 107-18.
81. GORONZY JJ, FULBRIGHT JW, CROWSON CS, POLAND GA, O'FALLON WM, WEYAND CM: Value of immunological markers in predicting responsiveness to influenza vaccination in elderly individuals. *J Virol* 2001; 75: 12182-7.
82. VALLEJO AN, WEYAND CM, GORONZY JJ: T-cell senescence: a culprit of immune abnormalities in chronic inflammation and persistent infection. *Trends Mol Med* 2004; 10: 119-24.

83. WEYAND CM, FUJII H, SHAO L, GORONZY JJ: Rejuvenating the immune system in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5: 583-8.
84. GROLLEAU-JULIUS A, HARNING EK, ABERNATHY LM, YUNG RL: Impaired dendritic cell function in aging leads to defective antitumor immunity. *Cancer Res* 2008; 68: 6341-9.
85. PANDA A, QIAN F, MOHANTY S *et al.*: Age-associated decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts influenza vaccine response. *J Immunol* 2010; 184: 2518-27.
86. CAMPISI J, D'ADDA DI FAGAGNA F: Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 729-40.
87. LEE HY, OH BH: Aging and arterial stiffness. *Circ J* 2010; 74: 2257-62.
88. LI M, FUKAGAWA NK: Age-related changes in redox signaling and VSMC function. *Antioxid Redox Signal* 2010; 12: 641-55.
89. SAWABE M: Vascular aging: from molecular mechanism to clinical significance. *Geriatr Gerontol Int* 2010; 10 (Suppl. 1): S213-20.
90. WANG M, MONTICONE RE, LAKATTA EG: Arterial aging: a journey into subclinical arterial disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010; 19: 201-7.
91. BETTELLI E, CARRIER Y, GAO W *et al.*: Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441: 235-8.
92. KOENEN HJ, SMEETS RL, VINK PM, VAN RIJSSEN E, BOOTS AM, JOOSTEN I: Human CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>pos</sup> regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* 2008; 112: 2340-52.
93. SAMSON M, AUDIA S, JANIKASHVILI N *et al.*: Brief report: inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg cell imbalance in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 2499-503.
94. CATANOSO MG ML, PIPITONE N, VERSARI A *et al.*: Tocilizumab: A novel therapy for patients with large-vessel vasculitis. *Arthritis Rheum* 2011; 63: S588.
95. SALVARANI C, MAGNANI L, CATANOSO M *et al.*: Tocilizumab: a novel therapy for patients with large-vessel vasculitis. *Rheumatology* (Oxford) 2012; 51: 151-6.
96. SEITZ M, REICHENBACH S, BONEL HM, ADLER S, WERMELINGER F, VILLIGER PM: Rapid induction of remission in large vessel vasculitis by IL-6 blockade. A case series. *Swiss Med Wkly* 2011; 141: w13156.
97. UNIZONY S A-UL, MILOSLAVSKY E, ARVIKAR SL, KHOSROSHAHI A, STONE JH: Tocilizumab for the treatment of large vessel vasculitis (giant cell arteritis, Takayasu arteritis) and polymyalgia rheumatica: a case series. *Arthritis Rheum* 2011; 63: S589.

## PUBLICATIONS PERSONNELLES

---

### ARTICLES ORIGINAUX

1/ S. Audia, C. Duchêne, **M. Samson**, G. Muller, P. Bielefeld, F. Ricolfi, M. Giroud, J.-F. Besancenot. Accident vasculaire cérébral ischémique de l'adulte jeune au cours de la maladie coéliquaue: À propos de deux observations. *La Revue de Médecine Interne*, 2008;3 :228-231.

2/ Lakomy D, Janikashvili N, Fraszczak J, Trad M, Audia S, **Samson M**, Ciudad M, Vinit J, Vergely C, Caillot D, Foucher P, Lagrost L, Chouaib S, Katsanis E, Larmonier N, Bonnotte B. Cytotoxic Dendritic Cells Generated from Cancer Patients. *Journal of Immunology*, 2011; 187:2775-82.

3/ S. Audia, **M. Samson**, J. Guy, N. Janikashvili, J. Fraszczak, M. Trad, V. Leguy, S. Berthier, T. Petrella, S. Aho-Glélé, L. Martin, M. Maynadié, B. Lorcerie, P. Rat, N. Cheynel, E. Katsanis, N. Larmonier, B. Bonnotte. Immunological effects of rituximab on the human spleen in immune thrombocytopenia. *Blood*, 2011; 118: 4394-400.

4/ **M. Samson**, S. Audia, N. Janikashvili, M. Ciudad, M. Trad, J. Fraszczak, P. Ornetti, J.F. Maillefert, P. Miossec, B. Bonnotte. Inhibition of IL-6 function corrects Th17/Treg imbalance in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis and Rheumatism*, 2012; 64:2499-503.

5/ **M. Samson**, J.F. Maillefert, C. Roy, C. Cadet and P. Ravaud. Do Hip OA Patients Referred to Orthopedic Surgeons by General Practitioners and Rheumatologists Differ? *Clinical Rheumatology* 2012 ; 31 :1301-7.

6/ **M. Samson**, S. Audia, J. Fraszczak, M. Trad, P. Ornetti, D. Lakomy, M. Ciudad, V. Leguy, S. Berthier, J. Vinit, P. Manckoundia, J-F Maillefert, J-F Besancenot, S. Aho-glele, NO Olsson, B. Lorcerie, L. Guillevin, L. Mouthon, P. Saas, A. Bateman, L. Martin, N. Janikashvili, N. Larmonier and B. Bonnotte. Th1 and Th17 lymphocytes expressing CD161 are implicated in Giant Cell Arteritis and Polymyalgia Rheumatica pathogenesis. *Arthritis and Rheumatism* 2012 ; 64 : 3788-98.

7/ C. Tinel, **M. Samson**, L. Martin, B. Bonnotte, C. Mousson. Circulating and intragraft Th17 cells are not increased at early stage of chronic allograft nephropathy. *Transplantation Proceedings* 2012; 44: 2827-8.

8/ **M. Samson**, X. Puéchal, H. Devilliers, C. Ribi, P. Cohen, M. Stern, C. Pagnoux, L. Mouthon, L. Guillevin. Long-Term Outcomes of 118 Patients with Eosinophilic Granulomatosis with Polyangiitis (Churg-Strauss Syndrome) enrolled in two prospective trials. *Journal of Autoimmunity* 2013; 43: 60-9.

9/ S. Audia, **M. Samson**, M. Mahevas, C. Ferrand, M. Trad, M. Ciudad, A. Gautheron, F. Seaphanh, V. Leguy-Seguin, S. Berthier, B. Salles, L. Martin, B. Lorcerie, P. Ortega-Deballon, O. Facy, D. Caillot, A. Soudry-Faure, M. Michel, B. Godeau, N. Larmonier, P.

Saas, N. Janikashvili, and B. Bonnotte. Preferential splenic CD8+ T cell activation in rituximab-non responder patients with immune thrombocytopenia. *Blood* 2013; 122:2477-86.

**10/** Charles P, Bienvenu B, Bonnotte B, Gobert P, Godmer P, Hachulla E, Hamidou M, Harlé JR, Karras A, Lega JC, Le Quellec A, Mahr AD, Mouthon L, Papo T, Puéchal X, Pugnet G, **Samson M**, Sibilia J, Terrier B, Vandergheynst F, Guillevin L; FVSG. Rituximab: Recommendations of the French Vasculitis Study Group (FVSG) for induction and maintenance treatments of adult, antineutrophil cytoplasm antibody-associated necrotizing vasculitides. *La Presse Médicale* 2013; 42: 1317-30.

**11/ M. Samson**, X. Puéchal, H. Devilliers, C. Ribi, P. Cohen, B. Bienvenu, M. Ruivard, B. Terrier, C. Pagnoux, L. Mouthon, L. Guillevin. Long-Term Follow-up of a Randomized Trial on 118 patients with Polyarteritis Nodosa or Microscopic Polyangiitis without Poor-Prognosis Factors. *Autoimmunity Reviews* 2014; 13: 197-205.

**12/ M. Samson**, A. Jacquin, S. Audia, B. Daubail, H. Devilliers, T. Petrella, L. Martin, J. Durier, J.-F. Besancenot, B. Lorcerie, M. Giroud, B. Bonnotte, Y. Béjot. Stroke associated with giant cell arteritis: a population-based study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2014. Accepted.

**13/ M. Samson**, X. Puéchal, H. Devilliers, C. Ribi, P. Cohen, B. Bienvenu, B. Terrier, C. Pagnoux, L. Mouthon, L. Guillevin. Mononeuritis multiplex predicts the need for immunosuppressive or immunomodulatory drugs for EGPA, non-HBV PAN and MPA patients without poor-prognosis factors. *Autoimmunity Reviews* 2014. Accepted

**14/** S. Audia, M. Rossato, K. Santegoets, S. Spijkers, R. Wichers, C. Bekker, A. Bloem, L. Boon, T. Flinsenberg, E. Compeer, T. van den Broek, O. Facy, P. Ortega-Deballon, S. Berthier, V. Leguy-Seguin, L. Martin, M. Ciudad, **M. Samson**, M. Trad, B. Lorcerie, N. Janikashvili, P. Saas, B. Bonnotte, and T. Radstake. Splenic TFH expansion participates in B cell differentiation and antiplatelet antibody production via CD40L and IL-21 during adult immune thrombocytopenia. *Blood* 2014; accepted.

**15/** M. Blot, P. Boyer, **M. Samson**, S. Audia, H. devilliers, V. Leguy, S. Berthier, J.-F. Besancenot, B. Lorcerie, D. Lakomy, B. Bonnotte. Should mild hypogammaglobulinemia be managed as severe hypogammaglobulinemia? A study of 389 patients with secondary hypogammaglobulinemia. *European journal of internal medicine* 2014; accepted.

## REVUES GENERALES

**1/ M. Samson**, D. Lakomy, S. Audia, B. Bonnotte. Les Lymphocytes T<sub>H</sub>17 : différenciation, phénotype, fonctions, implications en pathologie et thérapeutique humaine. *La revue de Médecine Interne*, 2011; 32 : 292-301.

**2/ M. Samson**, S. Audia, D. Lakomy, B. Bonnotte, C. Tavernier, P. Ornetti. Diagnostic strategy after the discovery of hypogammaglobulinemia in rheumatology. *Bone Joint Spine*, 2011; 78 :241-245.

**3/ M. Samson** et B. Bonnotte. Pathogénie de la maladie de Horton. *La Presse Médicale*, 2012 ; 41 : 937-47.

**4/ M. Samson**, S. Audia, L. Martin, N. Janikashvili, B. Bonnotte. Pathogenesis of Giant cell arteritis: new insight into the implication of CD161+ T cells. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2013; 31: 65-73.

## LETTRES A LA REDACTION

**1/ M. Samson**, B. Bonnotte. Reply to the letter: "Regulatory T cells in giant cell arteritis: might there be another target for adjuvant treatment?" *Arthritis and Rheumatism* 2013; 65: 289-90.

**2/ M. Samson**, N. Janikashvili, L. Martin, S. Audia, B. Bonnotte. REPLY TO THE LETTER: "Functionally relevant regulatory T cells are present in Giant-Cell Arteritis lesions." *Arthritis and Rheumatism* 2013; 65: 1134-5.

**3/ M. Samson**, S. Audia, N. Janikashvili, B. Bonnotte. Are IL-10+ regulatory Th17 cells implicated in the sustained response to glucocorticoid treatment in patients with Giant Cell Arteritis? Comment on the paper of Espigol-Frigole et al. *Annals of the Rheumatic diseases* 2013;72: e3.

**4/ M. Samson**, S. Audia, N. Janikashvili, B. Bonnotte. Is TNF- $\alpha$  really involved in Giant Cell Arteritis pathogenesis? *Annals of the Rheumatic diseases* 2014; 73: e1.

**5/ M. Samson** and L. Guillevin. RESPONSE TO: Five-Factor Score in patients with eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (Churg–Strauss; EGPA): to use or not to use? *Annals of the Rheumatic diseases* 2014;73: e13.

**6/ M. Samson**, S. Audia, P. Ornetti, J.-F. Maillefert, N. Janikashvili, B. Bonnotte. Does tocilizumab indeed decrease the frequency of Th17 cells: comment on the paper from Thiolat A. et al. *Arthritis and Rheumatology* 2014. Accepted.

## COMMUNICATIONS CONCISES

**1/ M. Samson**, S. Audia, C. Duchêne, I. Perinet, P. Bielefeld, J.-F. Besancenot. Maladie de Crohn au cours d'une sclérose en plaques : rôle de l'interféron beta. *La Revue de Médecine Interne*, 2009;30 :816-819.

**2/ M. Samson**, S. Audia, M. Georges, E. Collet, C. Camus, Ph. Camus, P. Bonniaud. Une éruption cutanée. *La Revue de Médecine Interne*, 2010;31 :236-7.

**3/ M. Samson**, A. Jibbaoui, P. Foucher, M. Funes de la Vega, Ph. Camus, P. Bonniaud. Hémoptysie chez un fumeur révélant une trachéobronchopathie ostéochondroplastique. *La Presse Médicale*, 2010;39 :151-3.

4/ Vinit J\* & **Samson M\***, Gaultier JB, Laquerriere A, Ollagnon E, Petiot P, Marie I, Levesque H, Rousset H. Dysferline deficiency treated like refractory polymyositis. *Clinical rheumatology*, 2010;29:103-6. **\*equal contribution**.

5/ **M. Samson**, N. Roch, S. Audia, S. Berthier, V. Leguy, B. Bonnotte, B. Lorcerie. Ténosynovite d'étiologie inhabituelle au cours d'une sclérodermie. *La Presse Médicale*, 2011; 40 :877-81.

6/ **M. Samson**, S. Audia, V. Leguy, S. Berthier, N. Janikashvili, L. Martin, B. Bonnotte, B. Lorcerie. Haemolytic-uraemic syndrome during severe lupus nephritis: efficacy of plasma exchange. *Internal Medicine Journal*, 2012; 42: 95-8.

7/ **M. Samson**, C. Rossi, Z. Soltani, F. Charlotte, G. Zanetta, J.M. Rebibou. Perirenal fibrosis : make your diagnosis ! *Clinical Kidney Journal*, 2013.

8/ K. Bouiller\*, **M. Samson\***, J-C Eicher, S. Audia, S. Berthier, V. Leguy, O. Humbert, L. Martin, L. Lorgis, Y. Cottin, B. Bonnotte, B. Lorcerie. Severe cardiomyopathy revealing ANCA-negative eosinophilic granulomatosis with polyangiitis. *Internal Medicine Journal*. In Press, corrected proofs. **\*equal contribution**

## COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES

1 conférence sur invitation au cours d'un congrès international

23 communications orales dont 12 en tant qu'orateur dont 4 au cours d'un congrès international

33 communications affichées dont 15 en premier auteur

## **Etude de la réponse immunitaire T au cours de l'artérite à cellules géantes (maladie de Horton)**

Ce travail de thèse a été axé sur l'étude de la réponse immunitaire T chez des patients atteints d'artérite à cellules géantes (ACG) et de pseudo-polyarthrite rhizomélisque (PPR). Plusieurs études cliniques successives interrégionales ont permis d'inclure de nombreux patients (57 ACG et 27 PPR) des Centres Hospitaliers (CH) Universitaires et des CH de l'interrégion Est. Les échantillons sanguins ont été étudiés dans le laboratoire de l'unité INSERM U1098. Tout d'abord, nous avons confirmé l'implication des lymphocytes Th17 dans la pathogénie de l'ACG et avons montré pour la première fois leur implication au cours de la PPR. De plus, notre étude des lymphocytes T (LT) CD4<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup> a permis de mieux comprendre les mécanismes de plasticité entre les réponses Th1 et Th17 au cours de ces deux pathologies. Nous avons complété ces travaux par l'étude de la réponse T régulatrice en montrant qu'il existe un déficit quantitatif en Treg au cours de l'ACG et la PPR. Dans la suite de ce travail, nous avons mis en évidence, chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, que le blocage de la voie de signalisation de l'IL-6 par un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de l'IL-6 permet de corriger le déséquilibre de la balance Th17/Treg, en diminuant la réponse Th17 et en augmentant simultanément la réponse T régulatrice, à l'inverse des corticoïdes qui diminuent le pourcentage de Th17 sans corriger le déficit en Treg. Enfin, dans la dernière partie de ce travail, nous avons montré pour la première fois que les LT CD8<sup>+</sup> étaient également impliqués dans la pathogénie de l'ACG et la PPR.

Ces résultats ont permis de progresser dans les connaissances physiopathologiques de l'ACG et la PPR en évoluant d'un modèle articulé autour d'un déséquilibre de la balance Th1/Th2 vers celui d'un déséquilibre de la balance Th17/Treg et permettent de proposer des thérapeutiques mieux ciblées pour l'ACG et la PPR.

---

**Mots clés :** artérite à cellules géantes, lymphocytes Th17, lymphocytes T régulateurs, lymphocytes T CD8, interleukine-6

**Laboratoire :** Inserm UMR 1098, équipe « Immunorégulation et Immunopathologie »